

# アトピー性皮膚炎の病態の理解に向けた 脂質シグナル伝達機能の研究

2014 年

清水 嘉文

# 目次

緒言 .....	2
第一章 .....	8
序論 .....	8
第一節・実験方法 .....	9
第二節・結果 .....	13
第三節・考察 .....	18
第二章 .....	20
序論 .....	20
第一節・実験方法 .....	21
第二節・結果 .....	34
第三節・考察 .....	43
総括 .....	47
参考文献 .....	49
論文目録 .....	61
謝辞 .....	62

## 緒言

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) は、「増悪・寛解を繰り返す痒みのある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因（アレルギー体質）を持つ」と定義されている[1]。厚生労働省によると、この 10 年で乳幼児アトピー性皮膚炎の罹患率は 2 倍に増え、小学生の罹患率は約 11%、成人全体では約 7%と報告されており、アトピー性皮膚炎は子供の罹患率が高いという特徴を有する疾患である。この数十年では、特に先進国においてアトピー性皮膚炎の罹患率が急速に増加している[2]。しかし、その原因は未だ不明であり、遺伝的要因に加えて、環境要因、食物、精神的ストレス、全身及び局所の感染など様々な要素が関与すると考えられている[3]。「アトピー性皮膚炎」は、1933 年にアメリカの Sulzberger らにより提唱された疾患の名称であり、それまで様々な皮膚炎に分類されていたいくつかの皮膚炎が 1 つの疾患の異なる表現形であると定義されたものであり、多様な原因により多様な病態を示す[4]。アトピーという言葉は「奇妙な」もしくは「とらえどころのない」という意味のギリシャ語に由来しており、当時からその病因がわからず、不可解な疾患として認識されていたものと推察される。

アトピー性皮膚炎で見られる皮膚の炎症、掻痒（痒み）、肌の乾燥という症状のうち、患者が最も苦しめられる症状は掻痒である。掻痒は古くから認識されてきた基本的な感覚であるにも関わらず、その研究は未だ途上にある。掻痒の感覚の多くは表皮と真皮の境界部に存在する知覚神経繊維（C 繊維）の神経終末が化学的、物理的、電気的刺激などにより活性化されて生じたインパルスが後根神経節、脊髄視床路、視床、大脳皮質に到達することで認識されると考えられている[5]。古くは、弱い痛み刺激が掻痒を起こすと想定されていたが、現在では掻痒も痛みも C 繊維により伝達されるものの、それぞれ独立した感覚であると考えられている[5]。アトピー性皮膚炎では、掻痒が掻破を誘発して皮膚状態を悪化させ、さらに痒みが増強する、掻痒と掻破の悪循環 (itch-scratch-cycle) と呼ばれる現象が存在する[6]。掻破は生理的には、表皮を削り取り、皮膚の表面に付着または内部に侵入した異物を排除する反応と考えられており、健常な皮膚では掻痒によって誘導された掻破により掻痒感が消失するため、過剰な掻破による皮膚障害を発現することはないが、アトピー性皮膚炎患者においては、掻破によりさらに掻痒が増し、過剰な掻破行為により、さらに皮膚炎が悪化する。これまでに、アトピー性皮膚炎において掻痒を惹起する、または調節している可能性のある物質として、ヒスタミン、アセチルコリン、substance P、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、morphine、enkephalines、endorphins、triptase、IL-2、platelet-activating factor (PAF) などが報告されている[7-21]。しかし、アトピー性皮膚炎における掻痒誘発因子の探索は現在も研究の途中であり、その同定及び調節機構の解明は今後の重要課題となっている (Table 1)。

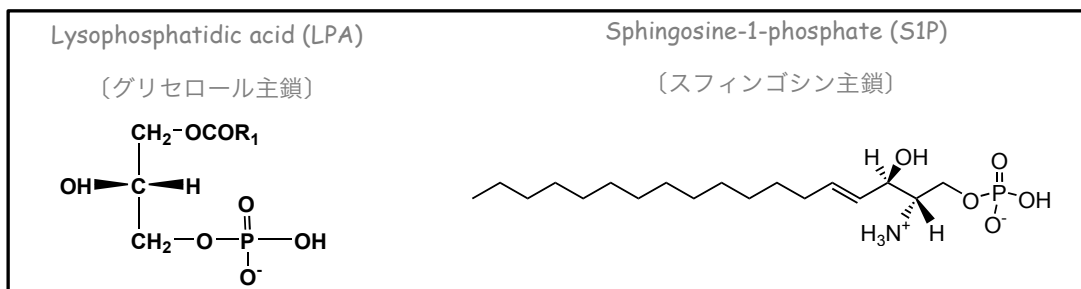
Mediator	Mechanism
Amine: Histamine	direct binding to 'itch receptor' neurogenic inflammation
Neurotransmitter	
Acetylcholine	mechanism not known
Neuropeptides: substance P	histamine liberator
CGRP	histamine liberator, increase of IL-8
Opioid peptides: morphine	perception, histamine-independent
enkephalines	modulation of itch
endorphins	central and peripheral
Proteinases: tryptase	activates proteinase-activated receptor-2
Cytokines: interleukin-2	possibly release of various mediators
PAF	histamine liberator

**Table 1** Nociception in atopic skin : mediators and their mechanisms inducing pruritus in atopic dermatitis. Table 1 は[22]より引用、一部改変。

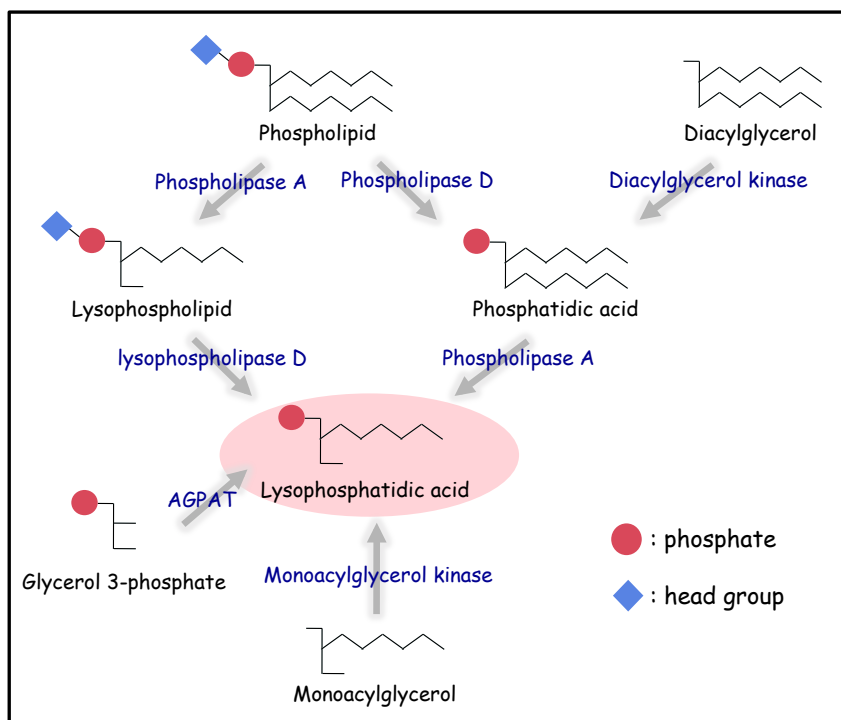
種々の刺激に応じて生体膜リン脂質が代謝されて生じる脂質代謝物のある種のものは、重要なシグナル伝達メディエーターとして機能することが明らかにされている。現在、脂質とそれらの誘導体は、単なる細胞膜構造エレメントや $\beta$ 酸化・解糖系での代謝源のみならず、疾患治療・予防のための重要なターゲット分子であると認識されている。こうしたリン脂質メディエーターの代表格は、リゾホスファチジン酸 (LPA : Lysophosphatidic acid) とスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P : Sphingosine 1-phosphate) である (Fig. 1)。前者はグリセロール骨格を、後者はスフィンゴシン骨格をそれぞれ有し、両者とも 1 つの炭化水素主鎖と 1 つのリン酸基を含んだ低分子量リン脂質 (500 ダルトン以下) であり、どちらもリゾリン脂質メディエーターと呼ばれている。LPA や S1P は非常にシンプルな構造の分子ではあるが、細胞増殖、血小板活性化、創傷治癒、免疫応答など多彩な生理活性を示すことが明らかとなっている[23-28]。現在でも、それらの生理活性についての報告は増え続けている。LPA と S1P に特異的な膜 7 回貫通ドメインを有する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は複数個同定されている。リゾリン脂質メディエーターのもつ多彩な生理活性は、これらの細胞表面に存在する受容体に結合し、多様な細胞シグナル伝達経路を活性化させることによる[26, 29, 30]。現時点では LPA には 6 種、S1P には 5 種の受容体が存在することが確定している。



**Figure 1** Structures of LPA and S1P



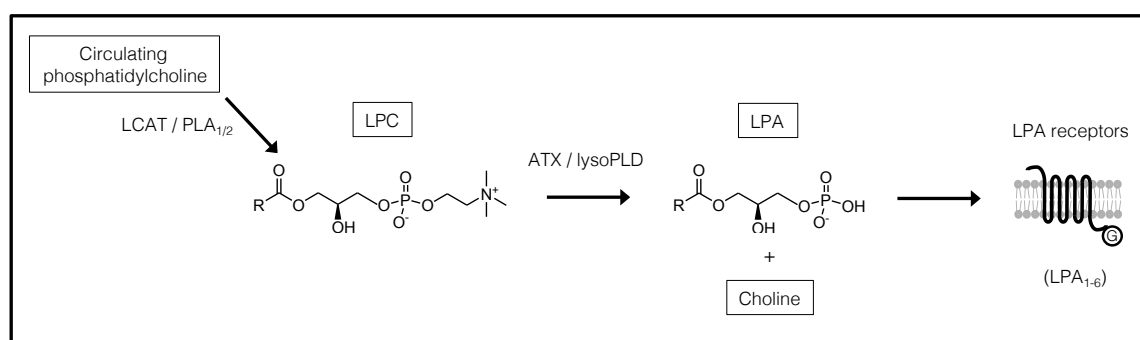
LPA は細胞内外で複数の経路により産生される (Fig. 2)。細胞外では細胞膜外層上でホスホリパーゼ D (PLD) の作用により生成したホスファチジン酸 (PA) から膜結合型ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) や A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) により生成する[31-33]。もうひとつの細胞外 LPA 産生経路は、ホスファチジルコリン (PC) などの細胞膜上のリン脂質から PLA<sub>1</sub> や PLA<sub>2</sub> により産生するリゾホスファチジルコリン (LPC) などのリゾリン脂質からリゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) による LPA への変換である[34-38]。一方、LPA は細胞内でグリセロリン脂質の *de novo* 合成経路の中間体などとして産生されるが[39]、受容体を介したシグナル伝達物質としての LPA の機能面から考えると細胞外での LPA 産生機構の方が重要であると考えられる。



**Figure 2** Synthetic pathways of LPA. LPA may be produced through various pathways. Head groups of phospholipids are cleaved by phospholipase D and the resulting phosphatidic acid is hydrolyzed by phospholipase A. Phosphatidic acid is also produced by diacylglycerol kinase. The acyl chain of a phospholipid is hydrolyzed by phospholipase A and the head groups of the resulting lysophospholipids are cleaved by lysophospholipase D to produce LPA. Addition of phosphate to monoacylglycerol by monoacylglycerol kinase is another pathway of LPA production. Also, an acyltransferase like GPAT may produce LPA from glycerol 3-phosphate. Fig. 2 は[39]より引用、一部改変。

オートタキシン (ATX : autotaxin) は、ヒトメラノーマ (悪性黒色腫) 細胞の培養上清より単離された腫瘍細胞運動性刺激因子であり[40]、癌細胞の細胞増殖、生存および遊走に加えて転移も促進する[25]。ATX 欠損マウスは (*ENPP2*<sup>-/-</sup> mutants)、血管形成異常や神経奇形により胎生致死である[41, 42]。生理的な血管新生や神経発育に ATX は必須である。2002 年に当研究室はヒト血漿中の lysoPLD 活性をもつ酵素を精製し、これが ATX と同一であることを明らかにした[43]。この当研究室の先駆的発見により、ATX の作用が、それ自身の有する酵素活性により産生される LPA の作用で説明可能となり、LPA/ATX 研究は大きく進展した。

循環血液中の ATX レベルは、白色脂肪組織や高内皮細胞 (HEC : high endothelial cell) からの分泌と肝類洞血管内皮細胞による分解で維持されている[44-46]。ATX のヘテロ接合体マウスは (*ENPP2*<sup>+/-</sup>) 成人期まで生存するが血漿 LPA 濃度は野生型マウスの約半分であり[41, 42]、血漿中の LPA の大部分は数百  $\mu$ M と高濃度で存在する LPC から lysoPLD 活性をもつ ATX により産生されていると考えられる (Fig. 3)。



**Figure 3** Synthetic pathways for plasma LPA. PC in lipoproteins serves as a substrate of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) or PLA<sub>1</sub>/PLA<sub>2</sub>, which converts PC to LPC. LPA is generated by hydrolysis of LPC by ATX/lysoPLD, which liberates the hydrophilic headgroup (choline).

その後、ATX と LPA を軸とする研究は急速に進展した。すでに掻痒と LPA-ATX の関連を示唆する研究がいくつか報告されており、注目を集めている。例えば、LPA 刺激は LPA 受容体を介した肥満細胞からのヒスタミン分泌および血漿浸出を誘発し、気道過敏の発症に関与する[47]。また、皮膚掻痒症を伴った胆汁うっ滞症患者では、健常人と比べ血清 lysoPLD 活性、血清中 ATX 蛋白発現レベルおよび血清中の LPA 量が高値であった[48]。興味深いことに、皮膚掻痒症を伴った胆汁うっ滞症患者で掻痒の強さと lysoPLD 活性の間には正の相関性が見られたのに対し、有力な掻痒誘発因子であるヒスタミン、トリプターゼ、サブスタンス P、オピオイド  $\mu$  では掻痒の強さとの間に関連性が見られなかった[48]。未だ掻痒と LPA-ATX との病態生理学的な関係性は不明ではあるが、本研究では、全身性のメディエーターである LPA やそれと関連する代謝酵素の調節異常がアトピー性皮膚炎の疾患形成に関与しているのではないかと考え、その仮説の検証を試みた。

本研究では、アトピー性皮膚炎患者の臨床試料、およびアトピー性皮膚炎モデル動物として繁

用繁殖されている NC/Nga マウスと近年開発された NOA マウスを用い、アトピー性皮膚炎の病態発現や増悪に LPA が関与しているかどうかを明らかにすることを目的として研究を行った。本論文は 2 章から構成されており、アトピー性皮膚炎における LPA の病態生理学的なメディエーターとしての可能性について第 1 章ではアトピー性皮膚炎患者の臨床試料を、第 2 章ではモデル動物を用いて検討を加えた。

# 第 1 章

## 第 1 章・序論

アトピー性皮膚炎 (AD, atopic dermatitis) と乾癬 (psoriasis) は炎症性皮膚疾患の代表格である。少なくともイニシエーション段階のアトピー性皮膚炎の炎症部には IL-4、IL-5、IL-10 などの  $T_H2$ -型のサイトカインが蓄積する[49-51]。一方で乾癬の病変形成には IL-12、IL-2、INF- $\gamma$  などの  $T_H1$ -型サイトカインが関わりと考えられ[52, 53]、 $T_H$ 細胞の極性化の違いがアトピー性皮膚炎と乾癬の主たる免疫病原性の差であると考えられてきた。アトピー性皮膚炎患者と乾癬患者間の検査所見の差として、乾癬では主に好中球の表皮への浸潤が、アトピー性皮膚炎では主に好酸球とリンパ球の表皮での蓄積が認められる。また、乾癬患者ではアトピー性皮膚炎の主症状である掻痒はほとんど見受けられない[54, 55]。しかし増悪・寛解を繰り返し慢性化したアトピー性皮膚炎患者では、乾癬患者と共通し表皮の過形成、異常なケラチノサイトの最終分化、樹状細胞浸潤などが認められ[56, 57]、アトピー性皮膚炎の病変形成には様々な要素が複雑に関与していると考えられる。アトピー性皮膚炎は外因性と内因性に分類され、IgE 高値を示す外因性型が 80%、正常な IgE 値を示す内因性型が 20%を占める[58]。これまでに内因性アトピー性皮膚炎患者には女性が多く、フィラグリン遺伝子の変異は低頻度であることが報告されている[58]、病因の探索は現在も研究の途中であり、その同定及び病態機構の解明は今後の重要課題となっている。

LPA (1- or 2-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate) は、多種の哺乳動物体液や組織中に微量存在するリン酸-グリセロール-脂肪酸という極めて単純な構造を有するリゾリン脂質である[24]。LPA は細胞表面に存在する LPA 受容体に結合し多彩な生理活性を発現する。LPA 刺激により、Jurkat T 細胞のケモキネシス[59]、マウスリンパ腫細胞株の侵襲性および極性化の促進[60]、モルモットおよびマウス好酸球の肺胞洗浄液への *in vivo*における浸潤の促進[61, 62]が誘導されることが明らかにされている。ヒト肥満細胞には LPA5 受容体が豊富に発現し、LPA がカルシウム動員やマクロファージ炎症性タンパク質- $1\beta$ 放出に関与することが報告された[63]。また近年、アレルギー性喘息患者の肺胞洗浄液中には 22:5、22:6 の脂肪酸を有する LPA が健常人と比較して多量に存在することが報告され[64, 65]、アレルギー疾患における LPA の病態生理学的な役割が注目されている。本研究で著者は、近年、先進国を中心に罹患率が増加しているアトピー性皮膚炎の病態の理解に向けて、免疫細胞に対する走化性作用や内皮透過性亢進作用を持つ循環 LPA の慢性的な濃度異常が、アトピー性皮膚炎の病変形成に関与しているのではないかと想定し、ヒト臨床試料を用いて検討した。

## 第 1 節・実験方法

### 1. 実験試薬

ウシ血清由来アルブミン (fatty acid-free) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。16:0-LPC、1,2-dilinoleoyl (18:2/18:2)-PC は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) より購入した。18:2-LPC は以前の報告のように[66] 1,2-dilinoleoyl-PC からブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (Sigma) 処理により調製した。60%過塩素酸、マラカイトグリーン、セモリブデン酸六アンモニウム四水和物 (粉末)、塩化コリン、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩酸は関東化学 (東京) から購入した。モリブデン酸アンモニウムは和光純薬工業 (東京) から購入した。Tween20 はナカライテスク (京都) から購入した。HA130 は Calbiochem (San Diego, CA, USA) より購入した。ペルオキシダーゼ (西洋ワサビ、グレードⅢ) はフナコシ (東京) から購入し、コリンオキシダーゼは東洋紡績 (大阪) から購入した。3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPPA) は東京化成 (東京) から購入した。TLC は Merck (Darmstadt, Germany) より TLC Silica gel 60 (Glass plates, 20×20 cm) を購入した。ECL Prime キットは GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA) から、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラット抗体は American Qualex (San Clemente, CA, USA) から購入した。その他の試薬は試薬特級品を使用した。

### 2. 実験試料

本研究で使用したヒト血清は徳島大学付属病院皮膚科に通う患者より同意を得て採取したものである。なお、本実験の内容は徳島大学の倫理委員会で審議され承認を得て行われたものである。血液は 33 名のアトピー性皮膚炎患者、26 名の乾癬患者および 12 名の健常者から得た (Table 2)。健常人の血液は当研究室の教員および学生から同意を得て徳島大学病院皮膚科にて採血したものである。

Diagnosis	No. of patients	Age, years
	(M/F)	(Mean $\pm$ SD)
Atopic dermatitis	33 (17/16)	30.4 $\pm$ 12.2
Psoriasis	26 (8/18)	53.5 $\pm$ 16.4
Healthy subjects	12 (5/7)	28.9 $\pm$ 13.2

**Table 2** Characteristics of study subjects.

### 3. 血清の調製

採取したヒト血液を室温下で 3 時間放置後、4℃、2000×*g* で 10 分間遠心分離した後、血清を回収し、試験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

### 4. リン脂質濃度の測定

Chalvardjian と Rudnicki の方法[67]に従い、脂質抽出物中の有機リン含量を測定し、これを基に全リン脂質濃度を求めた。この実験方法の概略を以下に示す。リン脂質を含む試料液の一定量を試験管に分取し、窒素ガス気流下で溶媒を蒸発留去した。これに 60%過塩素酸 0.1 mL および蒸留水 0.1 mL を加え、150-160℃で 90 分間加熱した。室温まで冷却した後、二回蒸留水 1 mL、4.2%モリブデン酸アンモニウム・マラカイトグリーン試薬 5 mL および 1.5% Tween 20 溶液 0.2 mL を加えてよく混合した後、島津 UV-1600 分光光度計で 660 nm の吸光度を比色定量した。

### 5. lysoPLD 活性の測定

コリン含有リン脂質の酵素的定量法を参考にし[68]、当研究室で構築した 1 次検定系を用いて、外因性 LPC を LPA とコリンに分解させた[43]。2 次検定のコリンの定量は、Zaitzu らの方法に基づき行った[69]。

#### 5-1. 1 次検定

ヒト血清試料を用いた一次検定は、0.03 あるいは 0.006 ml の血清試料を 0.1 あるいは 0.124 ml の生理食塩水で希釈し（それぞれ 4.3 あるいは 22 倍希釈となる）、0.07 ml の 0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解した基質溶液（16:0-あるいは 18:2-LPC）0.07 ml (0.5 mM) と混合させた。その後、DMSO に溶解した ATX 阻害剤溶液（HA130）0.002 ml あるいはコントロールとして DMSO のみを 0.002 ml 加え合計 0.2 ml とし、この混合液を 37℃で 24 時間インキュベートした。なお、インキュベートなしの 1 次検定溶液は、2 次検定を行う時まで-20℃で冷凍保存しておいた。

#### 5-2. 2 次検定

7.5 mM HPPA 0.2 ml、0.1 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.5）2.6 ml、2.0 U/ml ペルオキシダーゼ 0.1 ml、1 次検定液 0.1 ml、300 U/mL コリンオキシダーゼ 10  $\mu$ l を試験管内で混合し、振とうしながら 37℃で 15 分間インキュベートし、この試験液の蛍光強度を測定した。塩化コリンを用いて検量線を作製し、この検量線（0, 1, 3, 10, 30, 100 nmol/mL）と試料の

蛍光強度からコリンを定量し、これに基づき試料の lysoPLD 活性を算出した。以下に蛍光強度の測定条件、および Fig. 4 にコリン酵素共役蛍光測定法の原理を示す。

#### 《測定条件》

測定機器：日立蛍光分光光度計 F4500

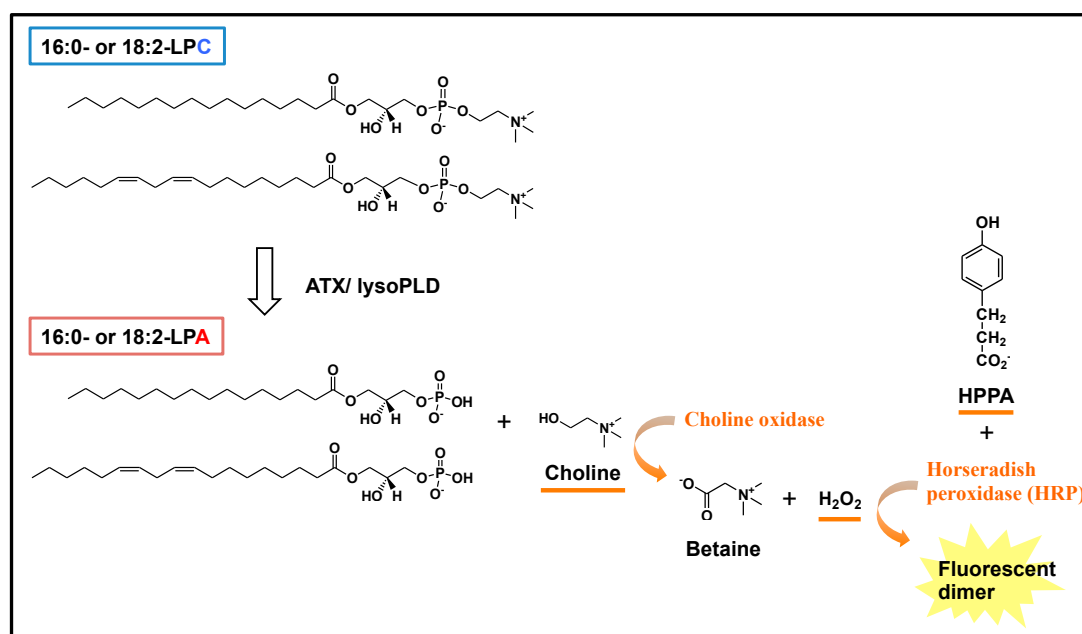
励起波長：320 nm

発光波長：404 nm

スリット（励起／発光）：2.5 nm／10.0 nm

ホトマル電圧：700 V

積算時間：10.0 sec



**Figure 4** A schematic pathway for production of fluorogenic substance during oxidation of choline derived from exogenous LPC by choline oxidase in the assay mixture for choline-producing activity.

## 6. 体液中の lysoPLD が ATX である可能性の検討

### 6-1. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は 10%アクリルアミドゲルを用いて Laemmli の方法[70]に従って行った。適した濃度に希釈した各試料を sample buffer (40% glycerol, 8% SDS, 250 mM トリス塩酸緩衝液 pH6.8, 5% 2-メルカプトエタノール、プロモフェノールブルー少量) と混合し、90℃の湯浴上で 5 分間加熱、電気泳動にかけた。その後、セミドライ転写装置で SDS-ポリアクリルアミドゲル中のタンパクを PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (ATTO) へ 108 mA、90 分の条件下で転写した。転写後の膜は 5%スキムミルクスキムミルク/Tween-Tris buffered saline (TTBS, 20 mM トリス塩酸緩衝液、0.5 M NaCl、0.05% Tween-20、pH 7.4) で 1 時間振と



うすることでブロッキングした。ブロッキング溶液を除去した後、ヒト抗 ATX 抗体 (3D1、150 倍希釈) で一晩振とうさせた。TTBS で十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラット抗体 (2000 倍希釈) で 2 時間振とうした。TTBS による洗浄を十分に行い、ECL Prime キットを用い LAS-4000 mini (富士フイルム) によってバンドを検出した。なお、バンドの強度は Multi Gauge (富士フイルム、version 3.2) によって定量した。

#### 《検出条件》

測定機器：LAS-4000 mini

Method：Chemiluminescence

Tray position：1

Exposure type：Precision (Exposure Time：15 s)

Sensitivity：Super

### 7. 酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)

アトピー性皮膚炎患者血清中の thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)、eotaxin-3/CCL26 および IgE の量は R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) の ELISA Kit で定量した。

### 8. 統計解析

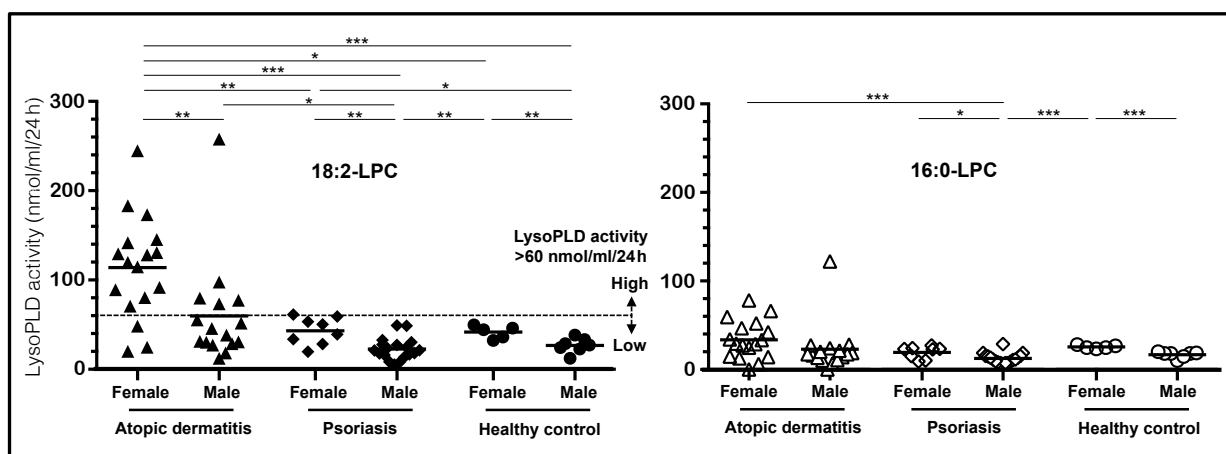
結果は Mann-Whitney *U*-test で解析した。データが正規分布しているものについて、対照群との間で Student の *t* 検定による 2 群間比較を行った。多群間の母平均について、Tukey の方法で比較を行った。差は  $P < 0.05$  で統計学的に有意であるとみなした。

## 第 2 節・結果

### 2-1. ヒト血清 lysoPLD 活性の比較

外因性基質として飽和型 16:0-LPC と不飽和型 18:2-LPC の分子種を使用して LPC から LPA と共に産生されるコリンを第 1 章・第 1 節・第 5 項で示した方法で定量し、血清中の lysoPLD 活性を算出した。なお Fig. 5 に示す lysoPLD 活性は血清中に元々存在する内因性の LPC から産生されるコリンも含めたものである。

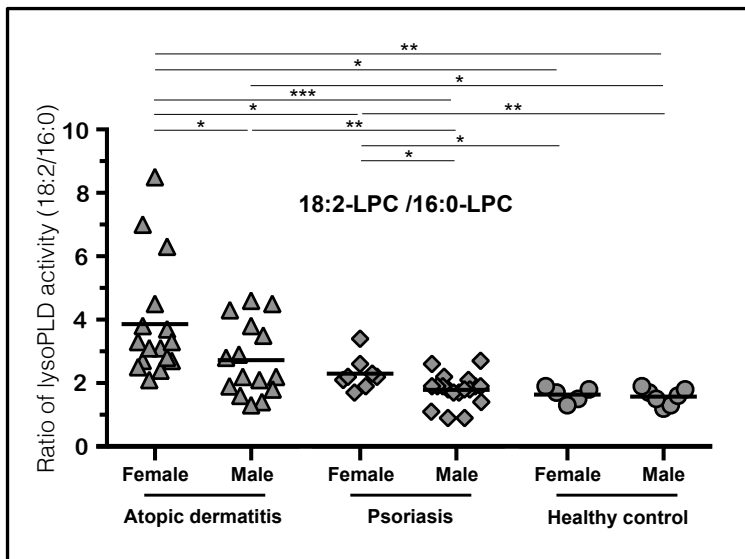
外因性 18:2-LPC に対する血清中の lysoPLD 活性は、乾癬患者および健常人のものと比較しアトピー性皮膚炎患者で有意に高値であった (Fig. 5, left)。同様の傾向は 16:0-LPC を外因性基質として用いた場合においても認められたが、アトピー性皮膚炎患者群と健常人群間で有意差は認められなかった (Fig. 5, right)。今回測定した全ての群において、外因性 LPC に対する活性は女性の方が男性より高値であった。



**Figure 5** Serum lysoPLD activity toward 18:2- (filled symbols, left) or 16:0-LPC (empty symbols, right) of AD patients, psoriasis patients, and healthy controls by sex.

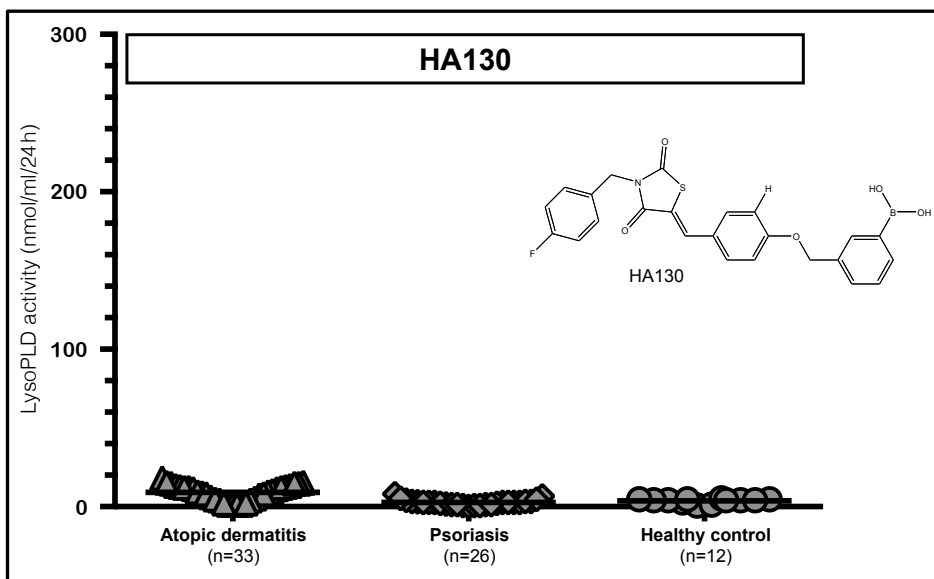
### 2-2. ヒト血清 lysoPLD/ATX の酵素学的検討

Fig. 5 で得られた値から 18:2-LPC に対する活性と 16:0-LPC に対する活性の比を算出した。当研究室の以前の報告と一致し[71]、測定した全ての群に共通して外因的に加えた 18:2-LPC に対する血清 lysoPLD 活性は 16:0-LPC に対するものより高値であった (Fig. 6)。さらに、この不飽和型の 18:2-LPC を基質として好む血清 lysoPLD 活性の特異性は、乾癬患者および健常人の血清と比較しアトピー性皮膚炎患者の血清で顕著であった (Fig. 6)。



**Figure 6** Ratios of serum lysoPLD activity for 18:2-LPC to that for 16:0-LPC of AD patients, psoriasis patients, and healthy controls by sex.

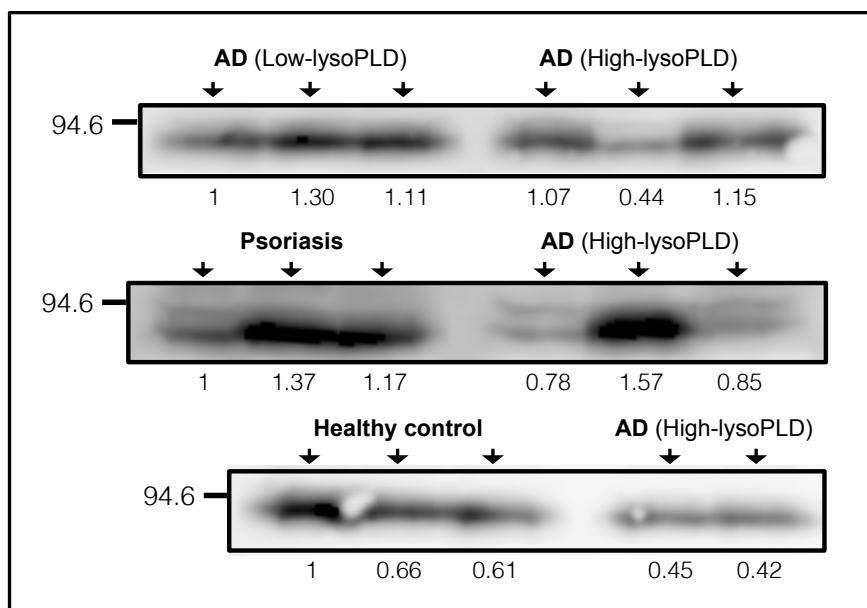
続いて Albers ら[72]により見出された ATX 特異的阻害剤を血清に添加し、今回の測定で認められた血清中の lysoPLD 活性がどの程度 ATX により担われているのかを検討した。解析の結果、今回測定した全ての群において外因性の 18:2-LPC に対する血清 lysoPLD 活性は HA130 処理により大幅に減弱した (Fig. 7)。



**Figure 7** Serum lysoPLD activity toward 18:2-LPC in the presence of ATX inhibitor HA130 (0.02 mM). Serum lysoPLD activity in patients with AD, patients with psoriasis, and healthy controls was greatly reduced by addition of HA130, indicating that most of the observed lysoPLD activity is due to ATX.

抗 ATX モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより、数例のアトピー性皮膚炎患者、乾癬患者および健常人血清中の ATX 抗原レベルを解析した。なおアトピー性皮膚炎患者は Fig. 5 で得られた 18:2-LPC に対する lysoPLD 活性に基づき、lysoPLD 活性が高い群 (>

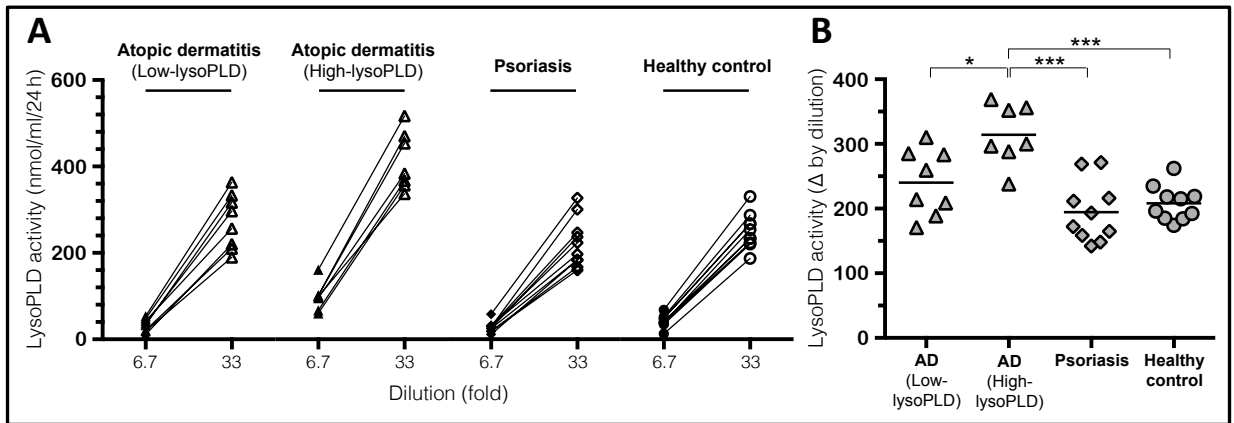
60nmol/ml/24h) と低い群 ( $\leq 60\text{nmol/ml/24h}$ ) に分類した。群内でのばらつきは認められたが、アトピー性皮膚炎患者、乾癬患者および健常人群間で血清中の ATX 抗原レベルの有意な差は認められなかった (Fig. 8)。



**Figure 8** Western blot analyses of ATX protein in serum of AD patients, psoriasis patients, and healthy controls were performed using an anti-ATX antibody (3D1). Values show the band intensity ratio between the lanes and are relative to that of leftmost lane, set as 1.

## 2-3. ヒト血清 lysoPLD 活性の希釈依存性

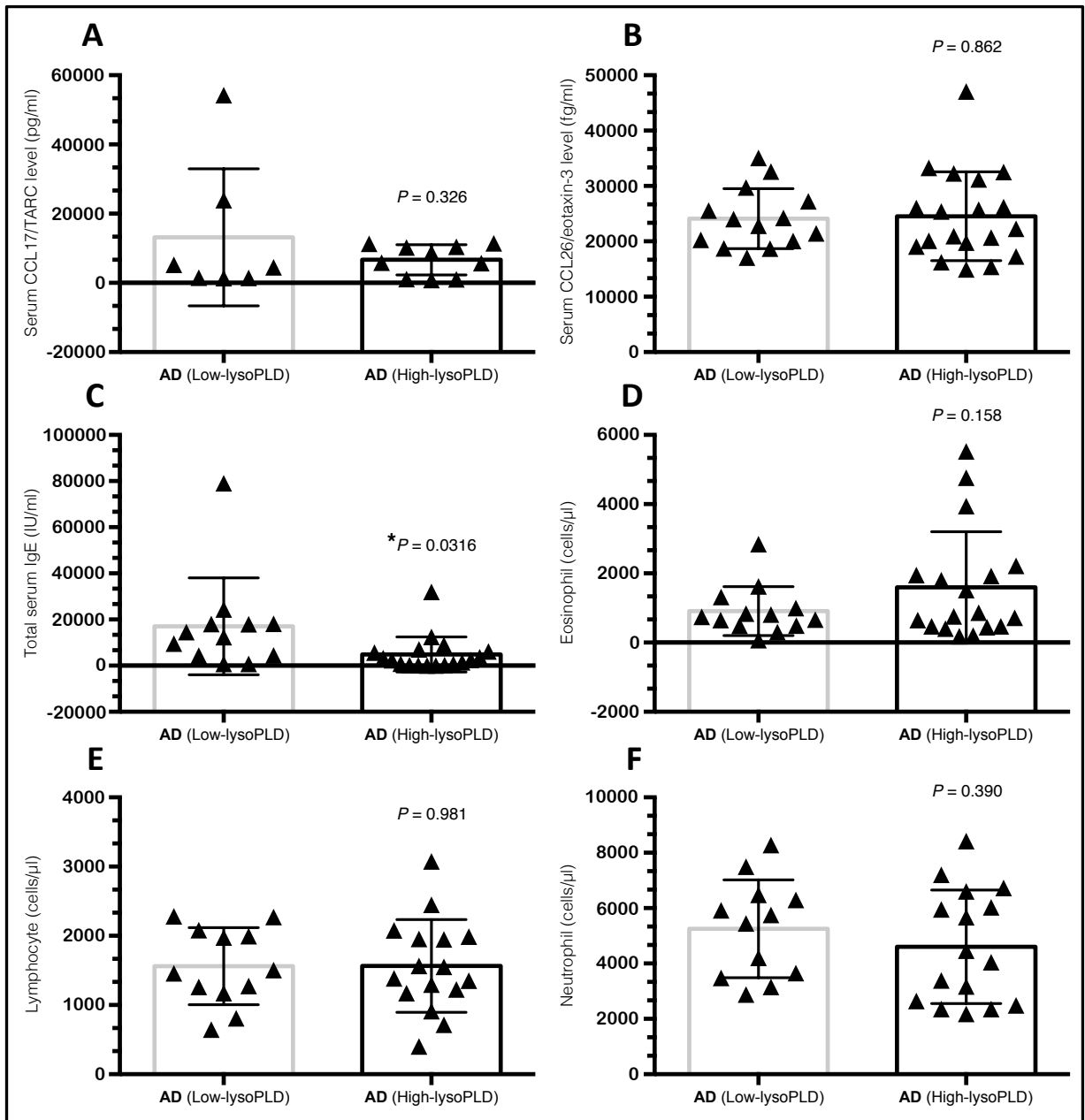
当研究室は以前、何らかのメカニズム (例えばアロステリックな機構) を介して lysoPLD 活性を阻害する因子がヒト血清中に存在すること、および生理食塩水で段階的に血清を希釈していくと阻害作用が非線形の様式で減弱することを報告している[71]。血清中の lysoPLD 活性は、乾癬患者および健常人のものと比較しアトピー性皮膚炎患者で有意に高値であったが (Fig. 5)、グループ間で血清中 ATX 抗原レベルでの有意な変動は認められなかった (Fig. 8)。筆者は、高い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者血清中では、内因性阻害因子が低レベルとなり、阻害作用の均衡が崩れて酵素活性が高値となっているのではないかと考え、数例のアトピー性皮膚炎患者、乾癬患者および健常人の血清を用い、0.15 mM 外因性 18:2-LPC の存在下で希釈依存性を解析し、この可能性を検討した。以前の当研究室の報告[71]と一致し、今回測定した全ての群で外因性の 18:2-LPC に対する血清 lysoPLD 活性は希釈に伴い増加した (Fig. 9A)。Fig. 9A で得られた値から希釈に伴う lysoPLD 活性の増加分を算出したところ、この増大幅は、低い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者、乾癬患者および健常人の血清と比較し高い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者の血清で有意に高値であった (Fig. 9B)。



**Figure 9** (A) Dilution-dependency of lysoPLD activity toward 18:2-LPC of sera from AD patients, psoriasis patients, and healthy controls. (B) The increments in serum lysoPLD activity of AD patients, psoriasis patients, and healthy controls due to the additional dilution of 6.7-fold diluted serum to 33-fold.

#### 2-4. アトピー性皮膚炎患者血清中の lysoPLD 活性と種々の検査値の相関関係の解析

血清中の lysoPLD 活性と種々の検査値の相関解析を調べ、アトピー性皮膚炎と lysoPLD 活性/LPA 軸の病態生理学的な関連性を検討した。Fig. 10-(A)は血清ケモカイン TARC/CCL17 レベル、(B)は血清ケモカイン eotaxin-3/CCL26 レベル、(C)は血清 IgE レベル、(D)は末梢血の好酸球数、(E)は末梢血のリンパ球数、(F)は末梢血の好中球数と血清 lysoPLD 活性との相関解析を示したものである。解析の結果、アトピー性皮膚炎患者において血清中の lysoPLD 活性と TARC および eotaxin-3 レベルとの間には関連性は認められなかった (Fig. 10A, B)。Fig. 10C に示すように、低い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者と比較し、高い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者で血清中 IgE レベルは有意に低値であった。末梢血の好酸球数と lysoPLD 活性との間には若干の相関関係が認められたが有意な差ではなかった (Fig. 10D)。また、末梢血のリンパ球数あるいは好中球数と血清 lysoPLD 活性との間には関連性は認められなかった (Fig. 10E, F)。



**Figure 10** Correlation of serum lysoPLD activity to serum levels of TARC (A), eotaxin-3 (B), IgE (C), and numbers of peripheral eosinophils (D), lymphocytes (E), and neutrophils (F) in patients with AD. The serum concentrations of TARC, eotaxin-3, and IgE were determined by ELISA.

### 第 3 節・考察

血清中の LPA レベルは、血清調整時の血小板凝集の程度により容易に影響を受け変動する[73, 74]。そこで本研究で著者は、循環 LPA レベルとアトピー性皮膚炎の病態生理的な関連性を ATX の lysoPLD 活性と抗原レベルを解析することで調べた。LPA はアクチン細胞骨格や細胞外マトリックスの再構築を制御し、内皮タイトジャンクションを乱すことで血管透過性亢進作用を示す[75, 76]。また LPA 刺激は、内皮の E-セレクトリンと血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 発現を増加させることが知られている[77]。最近の Kremer らによる報告[78]と一致し、血清中の lysoPLD 活性は、健常人のものと比較しアトピー性皮膚炎患者で有意に高値であった。このアトピー性皮膚炎患者で認められた lysoPLD 活性高値は、循環血液中での LPA 産生亢進につながり、血漿漏出や炎症細胞の病変部への異常な取り込みを誘発させているのかもしれない。

本研究結果から、アトピー性皮膚炎患者血清中では、内因性 lysoPLD 阻害因子が低レベルとなり、阻害作用の均衡が崩れて酵素活性が高値となっていることがわかった。血清中に存在する lysoPLD 活性阻害分子の探索は今後の課題である。また、アトピー性皮膚炎患者血清中の ATX は顕著に不飽和型 LPC を基質として好む性質を示した。LPA 受容体と LPA の親和性は、LPA が有する脂肪酸の不飽和度により変動することが知られており[79]、こうした ATX の基質特異性の変化は LPA シグナル伝達に影響を及ぼすかもしれない。今のところ詳細なメカニズムはわからないが、ATX の疎水性ポケットや触媒ドメインは生体内で何らかの内因性因子と相互作用し、かなり柔軟に立体構造を変化させていると考えられる。

以前 Masuda らにより、B 細胞新生物の患者血清中では ATX による LPA 産生が健常人と比較して亢進していることが報告された[80]。しかし本研究において、高い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者では、低い lysoPLD 活性を示すアトピー性皮膚炎患者と比較して血清中 IgE レベルは有意に低値であり、lysoPLD 活性と IgE レベルは負の相関関係にあった。アトピー性皮膚炎患者の B 細胞に対して LPA はネガティブな制御シグナルを伝達させているのだろうか。本研究においてこの問いに明確に答えられる結果は得られていない。

まとめると、本研究結果から、血清 lysoPLD 活性がアトピー性皮膚炎の有望なバイオマーカーおよび治療戦略のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

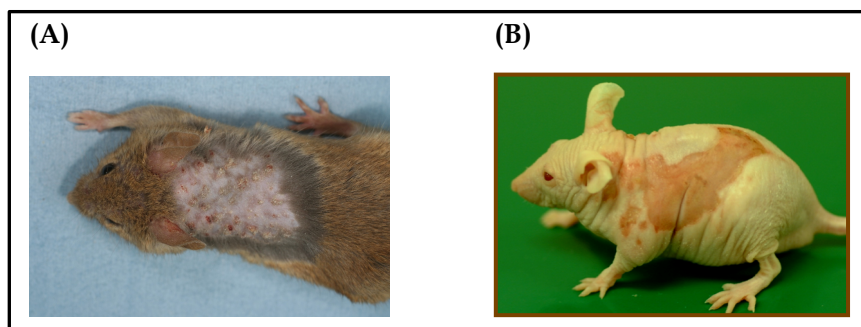
## 第 2 章



## 第 2 章・序論

脂質は生体の主要な構成成分であり、その大部分はグリセロリン脂質、コレステロールやスフィンゴ脂質として細胞膜を構成している。一方で、脂質メディエーターは種々の組織や体液に極微量の濃度で、かつ短い半減期で存在し、細胞膜上の G 蛋白質共役型受容体を介し細胞間メディエーターとして機能する。その中でも、LPA とスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、エイコサノイドなどに次ぐ第二世代の脂質メディエーターとして注目されている。本論文の第一章において主要な LPA 産生酵素である ATX/lysoPLD 活性が健康人のものと比較しアトピー性皮膚炎患者の血清で有意に高値であることを示した。本研究ではアトピー性皮膚炎モデル動物として繁用されている NC/Nga マウスと近年開発された NOA (Naruto Research Institute Otsuka Atrichia) マウスを用い、循環 LPA レベルとアトピー性皮膚炎の病態生理的な関連性を検討した。

アトピー性皮膚炎はそう痒と湿疹を伴う皮膚炎である。アトピー性皮膚炎の発病と増悪には遺伝的要因と環境要因が関与している[3]。アトピー性皮膚炎モデル動物として繁用される NC/Nga マウスは日本古来のニシキネズミを起源とし、ダニの存在するコンベンショナル環境下での飼育により耳介と頭部を中心に湿疹性の皮膚炎を自然発症する近交系マウスである (Fig. 11A)[81]。一方、NOA マウスは SPF 環境下で潰瘍性の皮膚炎を自然発症する無毛ミュータントマウスとして Kondo らにより確立された (Fig. 11B)[82]。NC/Nga マウスとは異なり、NOA マウスの病変発症部位に限定はない。両モデルマウスに共通してアトピー性皮膚炎患者と類似した掻破行動、血中 IgE 濃度の上昇、病変部での好酸球およびリンパ球の蓄積が認められる。



**Figure 11** Atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga and NOA mice. (A) A conventionally housed male NC/Nga mouse at 9 weeks old. (B) A NOA mouse (25 weeks old, male) housed under specific-pathogen-free (SPF) conditions.

## 第 1 節・実験方法

### 1. 実験試薬

EDTA-2K、*Flavobacterium heparinum* 由来ヘパリーナーゼⅢは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。ギ酸アンモニウム、ギ酸 (高速 LC 用)、ヘパリンナトリウム、塩化カルシウム、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、塩化マグネシウム(Ⅱ)六水和物、塩化バリウム(Ⅱ)二水和物は和光純薬工業 (東京) から購入した。蒸留水 (LC/MS 用)、メタノール (LC/MS 用)、2-プロパノール (高速 LC 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、塩化コバルト(Ⅱ)六水和物、塩化亜鉛、塩化マンガン(Ⅱ)四水和物、塩化ニッケル(Ⅱ)六水和物は関東化学 (東京) から購入した。28%アンモニア水はナカライテスク (京都) から購入した。Diocanoylglycerol pyrophosphate (8:0 DGPP)、17:0-LPC、15:0-LPC、S1P (d17:1) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) より購入した。15:0-LPA、17:0-LPA および 18:2-LPA は以前の報告のように[83]それぞれ 15:0-LPC、17:0-LPC あるいは 18:2-LPC から *Streptomyces chromofuscus* 由来ホスホリパーゼ D (PLD, Sigma) 処理で調製した。1-oleoyl-LPM (18:1-lysophosphatidylmethanol) は 1-oleoyl-LPC (Avanti) から *Actinomadura* sp. PLD (生化学工業、東京) によるホスファチジル基転移反応で調製した。2 ml のジエチルエーテル、0.5 ml の 10%メタノール、0.2 ml の 0.22 M  $\text{CaCl}_2$  に 18:1-LPC (15 mg) を溶解させ、0.4 ml の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液に溶かし込んだ PLD (20 units) を添加し、65℃下で激しく攪拌させながら 3 時間反応を行った。産物である 18:1-LPM は、クロロホルム/メタノール/水 (65:35:5, by vol) 混液を用いた TLC で精製した。1-linolenoyl-LPA (18:3-LPA) は 1,2-dilinolenoyl-PC (Avanti) から上記の PLA<sub>2</sub>、PLD 反応により反応により調製した。S32826 は Calbiochem (San Diego, CA, USA) と Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。ヒスタミン二塩酸塩、ナロキソン塩酸塩は Alexis-Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) から購入した。その他の試薬は試薬特級品を使用した。また、有機溶媒は関東化学から特級品を購入して使用した。

### 2. 実験試料

BALB/c マウスおよび NOA マウスは、日本クレア (東京) より、皮膚炎を発症したクリーン (conventional) NC/Nga マウスは日本 SLC (静岡) より購入し、試験に使用した。動物飼育にはマウスケージを用い、固形飼料の餌と水は自由摂取とした。なお、本実験は徳島大学動物実験倫理委員会の承認を得て行ったものである。NOA マウスおよび NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変を発症している個体は、それぞれ日本クレアおよび日本 SLC により選抜された。試験に使用した皮膚病変発症個体の NOA および NC/Nga マウスの週齢は 3-5 ヶ月齢であった。NOA マウスの皮膚病変を発症していない個体として 5 週齢のマウスも試験に用いた。コントロールとして使用した BALB/c マウスは、NOA および NC/Nga マウスの週齢と合わせるため 3-5 ヶ月齢のマウスおよび 5 週齢のマウスを用いた。なお実験に供したマウスはすべて♂

であった。

### 3. 血液サンプルの調製

#### 3-1. EDTA 処理血漿および EDTA 処理血液細胞画分

BALB/c、NOA、NC/Nga いずれのマウスにおいても、12 時間絶食をさせてから採血を行った。絶食後、ジエチルエーテル吸入麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血後、血液 1 ml に対し 1 mg の EDTA・2K (粉末) を事前に加えておいたマイクロチューブに採取した血液を加え混和した。4℃、1200×*g* で 25 分間遠心分離した後、上清を EDTA 血漿、下層を血液細胞画分として回収し、試験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

#### 3-2. ヘパリン処理血液

BALB/c あるいは NOA マウスを 12 時間絶食させてから採血を行った。血液 1 ml に対し 3 ユニットになるように、30-50  $\mu$ l の生理食塩水でヘパリンナトリウムを溶かし、事前にマイクロチューブに加えておいた。絶食後、ジエチルエーテル吸入麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血後、事前にヘパリンナトリウム溶液を加えておいたマイクロチューブに採取した血液を加え混和し、ヘパリン処理血液を調製した。ヘパリン処理血液は、貯蔵中に血球が壊れる恐れがあるため、調製後、直ちに試験に供した。

#### 3-3. ヘパリン処理血漿

第 2 章・第 1 節・第 3-2 項で調製したヘパリン処理血液を 4℃、1200×*g* で 25 分間遠心分離した後、ヘパリン血漿を回収し、試験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

#### 3-4. ヘパリン処理多血小板血漿

第 2 章・第 1 節・第 3-2 項で調製したヘパリン処理血液を 20℃、50×*g* で 20 分間遠心分離した後、ヘパリン処理多血小板血漿を回収した。ヘパリン処理多血小板血漿は、貯蔵中に血小板が壊れる恐れがあるため、調製後、直ちに試験に供した。

### 4. リン脂質濃度の測定

第 1 章・第 1 節・第 4 項 参照

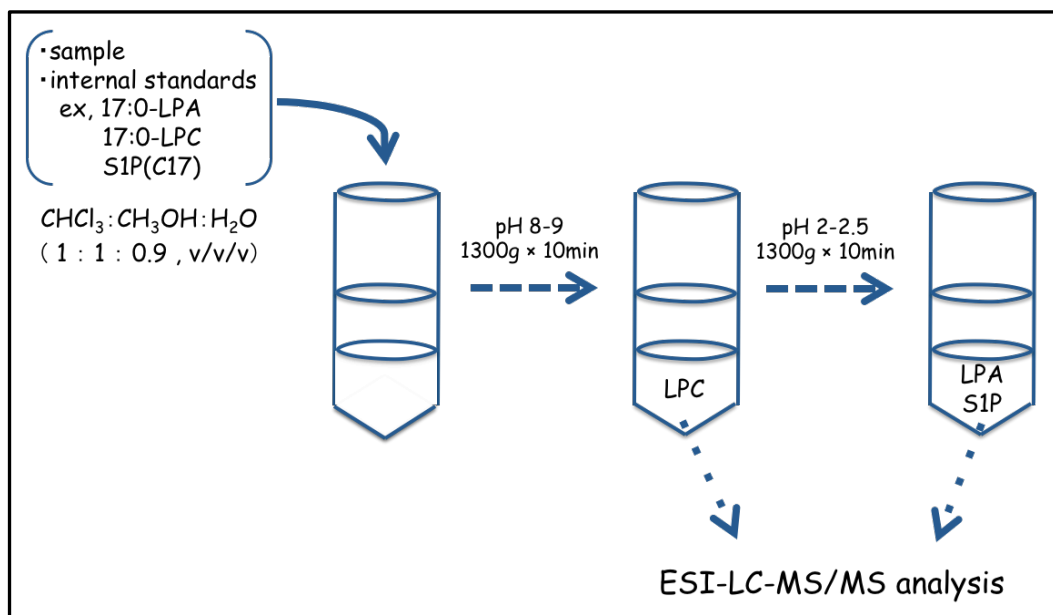
### 5. 脂質抽出

Bligh および Dyer が以前に報告した方法[84]を以下に示すように一部修正し、脂質抽出に適用した。

予め塩化カリウムを添加し、二回蒸留水を加えた試料 1 容量に対して、クロロホルム/メタノール (1:2) 混液 3.75 容量を加え、良く攪拌した。そこに内部標準品として 17:0 の分子種の脂質 (17:0-LPC、17:0-LPA、C17-S1P) を添加後、さらに、二回蒸留水 1.25 容量およびクロロホルム 1.25 容量を加え、良く攪拌した。次に 20%アンモニア水を加え、水層の pH を 8-9 に調整した。遠心分離 (1000×*g*, 10 分間、4℃) 後、パスツールピペットを用いて有機層を分取した (脂質画分-I)。上記の操作後、残りの水層に除去した有機層の容量分だけクロロホルム/メタノール (17:3) 混液を加え、十分に攪拌し、遠心分離 (1000×*g*, 10 分間、4℃) 後、同様に有機層を分取した (脂質画分-I)。残りの水層に除去した有機層の容量分だけ再びクロロホルム/メタノール (17:3) 混液を加え、続いて、5 N HCl を加え水層の pH を 2-2.5 に調整した。遠心分離 (1000×*g*, 10 分間、4℃) 後、有機層を分取した (脂質画分-II)。上記の操作後、残りの水層に除去した有機層の容量分だけクロロホルム/メタノール (17:3) 混液を加え、十分に攪拌し遠心分離 (1000×*g*, 10 分間、4℃) 後、同様の操作を行い有機層を分取した (脂質画分-II)。回収した脂質画分-I および脂質画分-II は第 1 章・第 1 節・第 6 項に示す LC-ESI-MS/MS 分析に供した。

なお、Fig. 12 に今回用いた脂質抽出法の概略を模式的に示す。LPC および LPA や S1P はそれらの極性の差から水層の pH を変動させることにより水層から有機層に段階的に移動させることができる。

**Figure 12** A scheme of Bligh & Dyer method



## 6. LC-ESI-MS/MS 分析

第2章・第1節・第5項で回収した脂質画分ⅠおよびⅡの溶媒を窒素気流下で除去し、5 mM ギ酸アンモニウム含有 メタノール：水 (95：5) の混液に溶かし分析用バイアルに転溶後、LC-ESI-MS/MS 分析に供した（メタノールと蒸留水は関東化学の LC/MS 用製品を、ギ酸アンモニウムは関東化学の特級品を使用）。

分析に用いた装置は以下の通りである。

〈Autosampler〉

HTS PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland)

〈LC〉

Agilent 1100 CapLC (Agilent Technologies)

〈MS〉

4000Q Trap (AB SCIEX)

### 6-1. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

リザーバには溶媒（移動相）を入れておいた。高圧ポンプ（溶媒送液システム、またはソルベントマネージャ）を使用し、指定流量の移動相を正確に送液した。インジェクタ（サンプルマネージャまたはオートサンプラー）により、一定に流れる移動相溶媒にサンプルが注入され、この移動相がサンプルを HPLC カラムに運んだ。カラムには分離に必要なクロマトグラフィー充填剤が入っており、この充填剤は、カラムのハードウェアにより所定の位置に固定されるため、固定相と呼ばれる。HPLC カラムから溶出する分離された化合物のバンドを検出器にて確認した。

### 6-2. エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法)

イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を用いた。ESI はソフトなイオン化法として知られており、高極性、難揮発性、熱不安定化合物に適用が可能な方法として、天然物、生体高分子、医薬品などの分析に汎用されている。

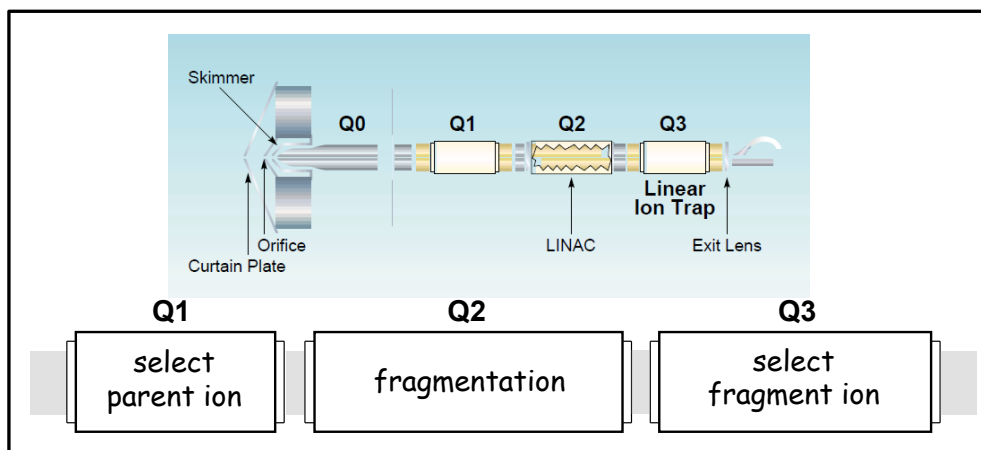
### 6-3. MRM モード (Multiple Reaction Monitoring モード)

MS の分析モードとしては、主に MRM モード (Multiple Reaction Monitoring モード) を用いた。Fig. 13 に MRM モードの概略図を示している、なお用いた 4000Q 内部構造の図は Applied Biosystems 社の HP より引用した。

注 1) MRM モードとは、一段目の四重極 (Q1) で親イオン（プレカーサーイオン）のみを通し、

そのイオンを次のコリジョンセル (Q2) で開裂させ、分析対象の化合物に特異的な娘イオン (プロダクトイオン) のみを二段目の四重極 (Q3) でモニターする方法である (Fig. 13)。この方法では、LC の保持時間情報以外に、化合物の特異的な質量情報で同定が可能となる。また、この質量情報を利用することで試料中の夾雑成分から目的化合物を質量数で分離することができるため、高い選択性、高い検出感度と S (シグナル) / N (ノイズ) 比が得られる。

**Figure 13** A scheme of Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode



ESI-LC-MS/MS 分析ではリン脂質をイオン化して測定するが、リン脂質はクラスごとにイオン化する際、プロトン化しやすいものと脱プロトン化しやすいものに分けることができる。そこで検出感度を上げるためにプロトン化しやすいものを陽イオンモードでプロトン化分子として、プロトン脱離しやすいものは陰イオンモードで脱プロトン分子として検出するのが通例である。実際に今回の分析対象脂質である LPA および S1P は陰イオンモードで、LPC は陽イオンモードで検出した。

また MRM モードで分析を行う際には Q1 と Q3 でそれぞれイオンを選択する必要がある。Fig. 14 に LPA、LPC および S1P のフラグメントイオンの構造を、Table 3 に Q1 と Q3 のイオンの組み合わせをそれぞれ示す。

**Figure 14** Structures of fragment ions produced from the molecular ion of LPA, S1P and LPC by ESI fragmentation

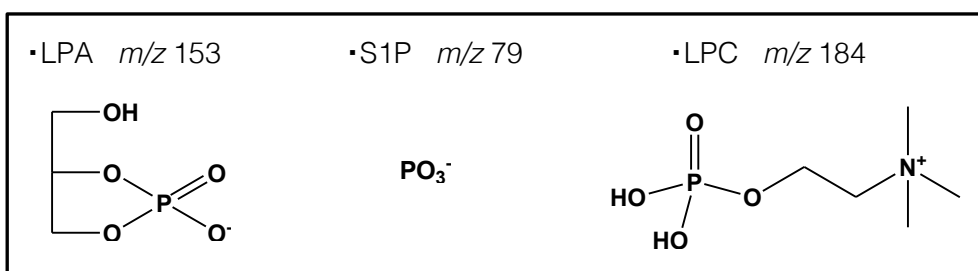


Table 3 Pairs of Q1 ion and Q3 ion for analysis of LPA, LPC and S1P

A	LPA		C	S1P	
	[M-H]-	[cyclic GP]-		[M-H]-	[PO <sub>3</sub> ]-
	Q1	Q3		Q1	Q3
16:0	409	153	d18:1	378	79
16:1	407	153	d18:0	380	79
17:0 (i.s.)	423	153	d17:1 (i.s.)	364	79
18:0	437	153			
18:1	435	153			
18:2	433	153			
18:3	431	153			
20:3	459	153			
20:4	457	153			
20:5	455	153			
22:6	481	153			

B	LPC	
	[M+H] <sup>+</sup>	[p-choline] <sup>+</sup>
	Q1	Q3
16:0	496	184
16:1	494	184
17:0 (i.s.)	510	184
18:0	524	184
18:1	522	184
18:2	520	184
18:3	518	184
20:3	546	184
20:4	544	184
20:5	542	184
22:6	568	184

注 2) LPA と LPC 分子種を示す略字において、コロンの前と後ろの数字は、それぞれ脂肪酸部の炭素数および二重結合数を示している。例えば 18:2-LPA とは炭素数 18、二重結合が 2 つの脂肪酸がグリセロール-3 リン酸にアシル型で付加されていることを意味する。一方 S1P の場合、脂肪酸ではなくスフィンゴシン骨格で分類され、d18:1 とは炭素数 18、二重結合 1 つ、OH 基が二つ (d とはジオール化合物の d を表す) というスフィンゴイド骨格にリン酸が付加されている構造であることを意味する。なお i.s. は内部標準物質 (internal standard) を意味する。

以下に今回の LPA、S1P および LPC 分析の際に用いたカラム、移動相、流速並びに MS で設定した各部位の電圧などについて記載する。

#### <LPA、S1P>

LC-カラム：ODS-100Z 逆相カラム (5  $\mu$ m, 2.0 $\times$ 150 mm)

移動相：5 mM ギ酸アンモニウム含有メタノール/水 (95:5, v/v) 混液

流速：220  $\mu$ l/min

declustering potential：-100.0 V

entrance potential：-10.0 V

collision energy：-32.0 V

collision cell exit potential：-7.0 V

curtain gas：20.0 psi

collision gas：6 psi

ion spray voltage：-4500.0 V

temperature：500.0  $^{\circ}$ C

ion source gas 1：70.0 psi

2：50.0 psi

#### <LPC>

LC-カラム：SUPELCO Ascentis Express C18 (2.7  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm)

移動相：5 mM ギ酸アンモニウム含有メタノール/水 (95:5, v/v) 混液

流速：200  $\mu$ l/min

declustering potential：76.0 V

entrance potential：10.0 V

collision energy：37.0 V

collision cell exit potential：16.0 V

curtain gas：20.0 psi

collision gas：6 psi

ion spray voltage：5500.0 V

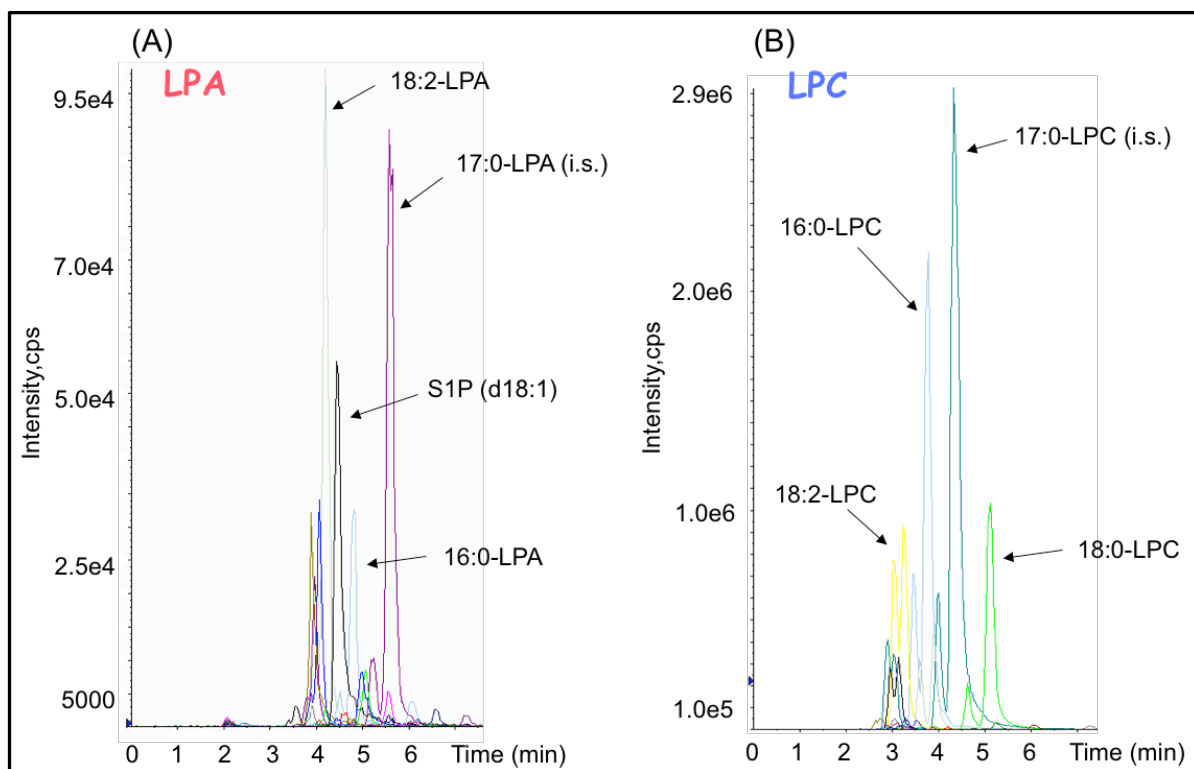
temperature：400.0  $^{\circ}$ C

ion source gas 1：30.0 psi

2：60.0 psi



Table 3 に示す Q1 と Q3 の値をセットすると、LPA、S1P、LPC のそれぞれの分子種ごとにピークを得られる。NOA マウス EDTA 血漿中の LPA、S1P、LPC の分析を行った際のマスクロマトグラムを 1 例として Fig. 15 に示す。



**Figure 15** Mass chromatograms of LPA, S1P and LPC. (A) Mass chromatograms of LPA and S1P. (B) Mass chromatograms of LPC.

リゾリン脂質分子内において脂肪酸は、グリセロール骨格の *sn*-1 位または *sn*-2 位の炭素のどちらかに結合しており、それらはそれぞれ 1-アシル体および 2-アシル体と呼ばれる。

注2) 脂肪酸の結合様式としてはアシル型以外にもアルケニル型、アルキル型があり、ラット及びヒト脳では、アルケニルアシル-エタノールアミンリン脂質が豊富に存在することが報告されている[85]。アルキル型のリン脂質メディエーター代表例は血小板活性化因子 PAF である。しかし、通常ではアシル型のリゾリン脂質が最も量的に多いため、Fig. 1 ではアシル型の LPA の構造式を例示しておく。

LPA と LPC のどちらも、1-アシル体と 2-アシル体は、今回の分析条件下において良好に分離された。先に溶出される（保持時間が短い）ピークが 2-アシル体、後に溶出される（保持時間が長い）ピークが 1-アシル体であった (Fig. 15)。

## 7. LC-ESI-MS/MS 分析による脂質の定量的解析

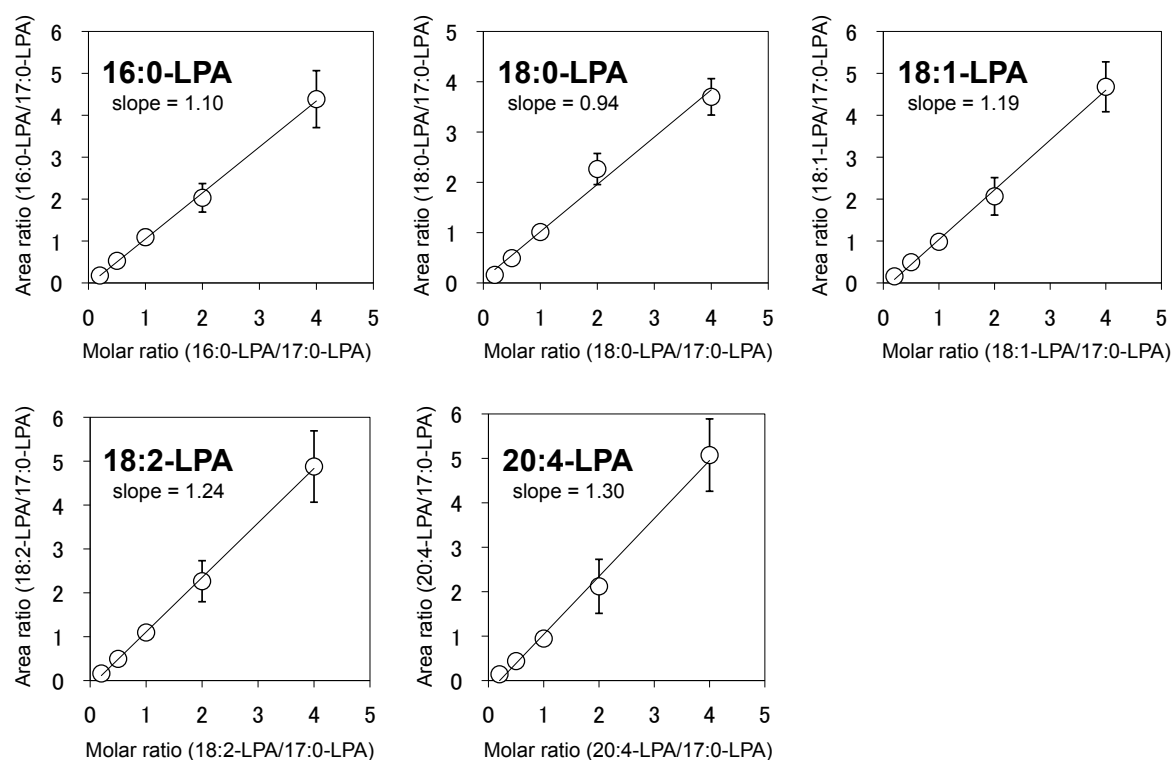
第2章・第1節・第6-3項で示したように、Q1とQ3の値をセットすることで、各脂質クラス・分子種ごとにピークを得ることが可能となる。そこで得られた目的化合物のピーク面積と内部標準物質のピーク面積の比から目的のリン脂質を定量した。なお、データ解析の際には、1-アシル体と2-アシル体のピーク面積を合計した値を用いて定量値を求めており、次式により濃度を算出した。

$$\text{目的リン脂質の濃度} = \frac{\text{目的リン脂質のピーク面積}}{\text{内部標準物質のピーク面積}} \times \text{加えた内部標準物質の濃度}$$

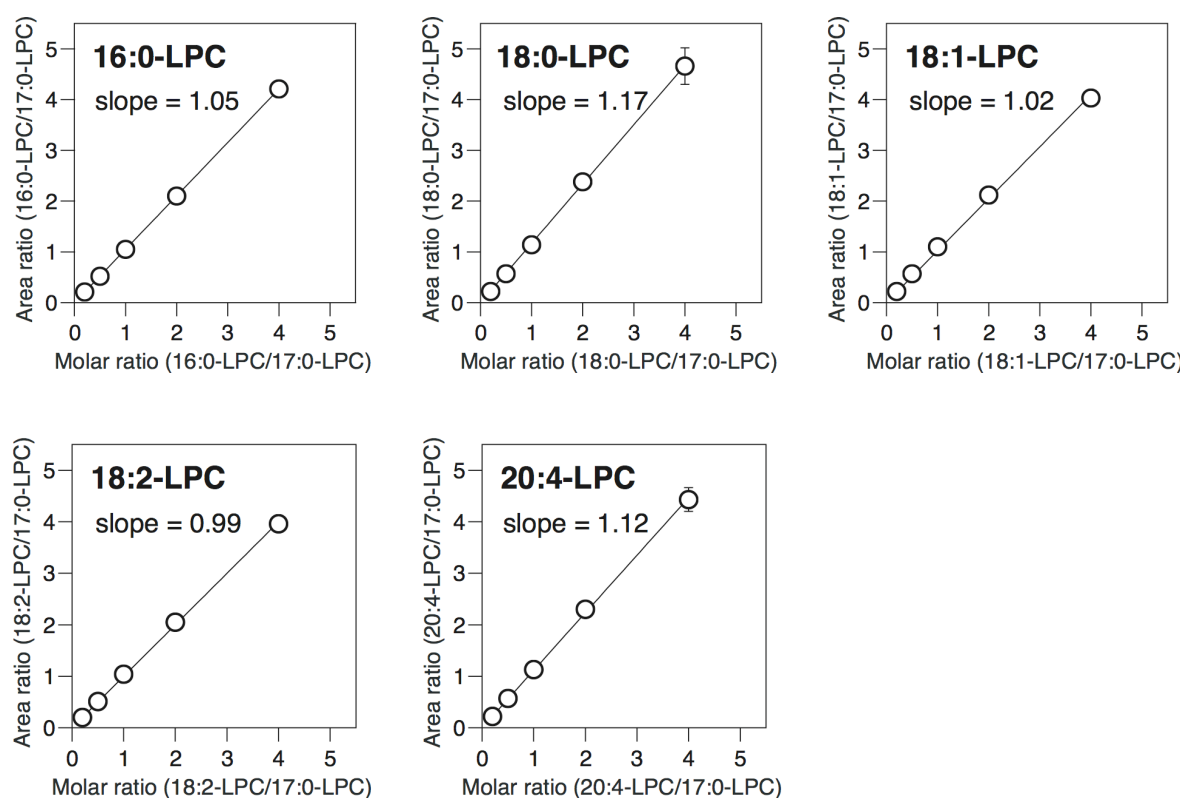
### 7-1. 補正值

MSによる定量的解析を行うためには、MSに注入した試料中の目的リン脂質の量と、それがイオン化して検出されるピーク面積の間に比例関係があることが必要である。そこで、内部標準物質である17:0型分子種の濃度を固定し、目的リン脂質の濃度を、17:0型分子種の濃度1に対してそれぞれ0.2、0.5、1、2、4の濃度で混合後測定し、それらのピークの面積比から検量線を作成した。この検量線の傾きは、MSに注入した分析目的リン脂質の17:0型分子種に対するイオン化のされやすさ（相対的イオン化効率）を表す。LPCとLPAについては、16:0、18:0、18:1、18:2、20:4型分子種について検量線を作成した。LPC及びLPAの17:0型分子種に対する各分子種の検量線の傾きは、多価不飽和脂肪酸のLPAでは若干高い傾向にあったが、それ以外はほぼ1となった（Fig. 16）。このため、これ以降は、目的リン脂質のピーク面積と内部標準物質のピーク面積の比から補正なしに目的リン脂質の濃度を求めることにした。S1Pの検量線は現在作成途中であるため今回は示していないが、これらも現段階でイオン化効率はほぼ1であることを予備的に確認している。

(A)



(B)



**Figure 16** Ionization efficiencies on quantification of LPA (A) and LPC (B).

## 8. lysoPLD 活性の測定

### 8-1. 1 次検定

試料（マウスより得たヘパリン処理血漿、多血小板血漿あるいは血液）0.04 ml を生理食塩水 0.098 ml で希釈した。続いて 0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解した基質溶液（16:0-あるいは 18:2-LPC）0.06 ml（0.167 あるいは 0.5 mM）を希釈試料に加えた。基質である LPC の最終最終濃度は 0.05 あるいは 0.15 mM となる。その後、DMSO（ジメチルスルホキシド）に溶解した ATX 阻害剤溶液（S32826 あるいは HA130）0.002 ml あるいはコントロールとして DMSO のみを 0.002 ml 加え合計 0.2 ml を混合した。その後、この混合液を 37℃で種々の時間インキュベートした。試料として多血小板血漿あるいは血液を用いた際には、インキュベート後に 4℃、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を 2 次検定に供した。なお、インキュベートなしの 1 次検定溶液は、2 次検定を行う時まで -20℃で冷凍保存しておいた。

なお外因的に LPC を基質として加えず、内因性基質からのコリン産生活性を測定する際には、LPC を加えていない 0.25% BSA 含有生理食塩水のみを混合させインキュベートし、その後、蛍光強度を測定し内因性基質からのコリン産生活性を求めた。また、二価カチオンや金属イオンキレーター（EDTA-2K）を添加した実験では、生理食塩水中にこれらを溶解させ用いた。

### 8-2. 2 次検定

第 1 章・第 1 節・第 5-2 項 参照

## 9. LPA 分解活性の測定

可溶性のリゾホスホリパーゼ活性はヘパリン血漿を、膜結合型の脂質リン酸ホスファターゼ（LPP：lipid phosphate phosphatase）活性はヘパリン血液をそれぞれ用い、外因的に加えた 15:0-あるいは 18:3-LPA に対する分解活性を測定した。

注3) 今回の対象脂質は LPA のみであるため、脂質抽出方法は第 2 章・第 1 節・第 5 項で記述の方法を一部修正し、pH はアルカリ性とせず酸性下でのみ抽出を行った。

### 9-1. リゾホスホリパーゼ活性の測定

スピッツ管にクロロホルム：メタノール（2：1）混液に溶解しておいた 15:0-LPA を 900 pmol 加え、窒素下で溶媒を除去した。そのスピッツ管に第 2 章・第 1 節・第 3-3 項で記述の方法で採取した BALB/c あるいは NOA マウスのヘパリン血漿を 450  $\mu$ l 加えた（15:0-LPA

の濃度は 0.002 mM となる)。弱めに 10 秒間混合し、450  $\mu$ l のうち 100  $\mu$ l を採取し第 2 章・第 1 節・第 5 項で記述した方法で脂質を抽出した（このサンプルはインキュベート 0 時間のサンプルに該当する）。残りの 350  $\mu$ l のサンプルは 37°C でインキュベートし、インキュベート開始 4、12 および 24 時間後に上記と同様に 100  $\mu$ l ずつ採取し脂質を抽出した。脂質抽出物は第 2 章・第 1 節・第 6 項で記述の方法で LC-ESI-MS/MS 分析に供した。

## 9-2. LPP 活性の測定

スピッツ管にクロロホルム：メタノール（2：1）混液に溶解しておいた 15:0-あるいは 18:3-LPA を 70 nmol 加え、窒素下で溶媒を除去した。そのスピッツ管に第 2 章・第 1 節・第 3-2 項で記述の方法で採取した BALB/c あるいは NOA マウスのヘパリン血液を 350  $\mu$ l 加えた（15:0-あるいは 18:3-LPA 濃度は 0.06 mM となる）。弱めに数回手で振って混合し、350  $\mu$ l のうち 100  $\mu$ l を採取し第 2 章・第 1 節・第 5 項で記述の方法で脂質を抽出した（このサンプルはインキュベート 1 min のサンプルに該当する）。残りの 250  $\mu$ l のサンプルは 37°C でインキュベートし、インキュベート開始 5 および 10 分後に上記と同様に 100  $\mu$ l ずつ採取し脂質を抽出した。脂質抽出物は第 2 章・第 1 節・第 6 項で記述の方法で LC-ESI-MS/MS 分析に供した。

## 10. 体液中の lysoPLD が ATX である可能性の検討

### 10-1. ウェスタンブロッティング

第 1 章・第 1 節・第 6-1 項 参照

## 11. 血液性状測定

マウス EDTA 処理血液は第 2 章・第 1 節・第 3-1 項で記述の方法で採取した。白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球色素濃度および血小板数は Celltac- $\alpha$  MEK-6358（日本光電、東京）で測定し、白血球の亜集団解析は Sysmex XT-2000iV（Sysmex 株式会社、神戸）で行った。

## 12. マウスを用いた痒みの評価試験

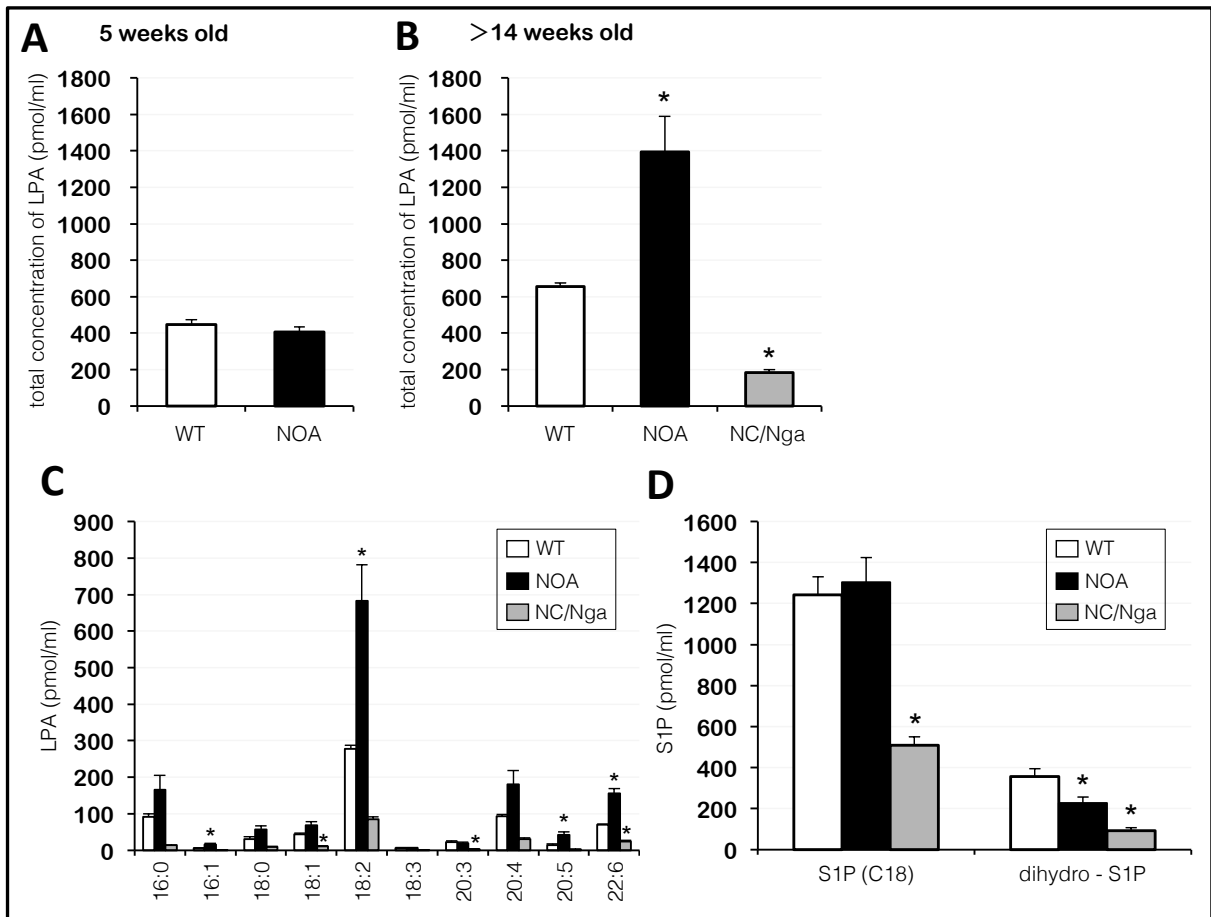
マウスの後肢による掻き動作を観察し、LPA の起痒メカニズムの解析を行った。試験は Kuraishi らの方法に従い雌性 ICR マウス（日本 SLC）を用い行った[86-89]。観察はプラスチックケージ（12×20×16 cm）を実験台上に 4 つ並べ、各ケージにマウスを 1 匹ずつ入れ、三脚で固定したビデオカメラ（JVC GZ-HM450-B）で上部より撮影することで行った。撮影後、ビデオを再生し、後肢による掻き動作の回数を数えた。マウスの掻き動作は非常に速く、

個々の掻き動作を肉眼で数えることは不可能であるので、後肢を挙げて掻いた後、後肢の指先を口に持って行くまでの一連の動作を 1 回の掻き動作として、皮内投与後の 20 分間にわたり計数した。マウスは周囲のヒトの存在や物音により掻き動作が抑制されるため[90]、薬学部動物舎に設置された実験室を使用者の方々に協力して頂き無人環境下とした。また、マウスは夜間に活発に活動し、日中は比較的活動性が低いため、行動の記録は日中に行った。皮内注射の前日に、肩甲骨付近の吻側背部の約 2 cm 四方の毛を予めバリカンで刈っておいた。この際、切創を作らないように注意し、切創のあるマウスは評価試験には用いなかった。マウスは初めての環境におかれると探索行動を行うことから、皮内投与の 1 時間前にはマウスを観察用ケージに移し試験環境に順応させた。今回の研究では起痒物質としてヒスタミン (50、100、150 nmol/site)、18:2-LPA (150 nmol/site) および 18:1-lysophosphatidylmethanol (LPM, 150 nmol/site) を用いた。これらの起痒物質は全て 0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解した。阻害剤としては dioctanoylglycerol pyrophosphate (DGPP, 1 mg/kg)、Ki16425 (1 mg/kg) およびナロキソン (1 mg/kg) を用いた。DGPP とナロキソンは 0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解させ、Ki16425 は少量のエタノールに溶解させた後、0.25% BSA 含有生理食塩水で希釈して試験に供した。DGPP と Ki16425 は起痒物質と共に皮内投与し、ナロキソンは起痒物質投与の 10-12 分前に皮内投与部位近傍に皮下投与した[91]。

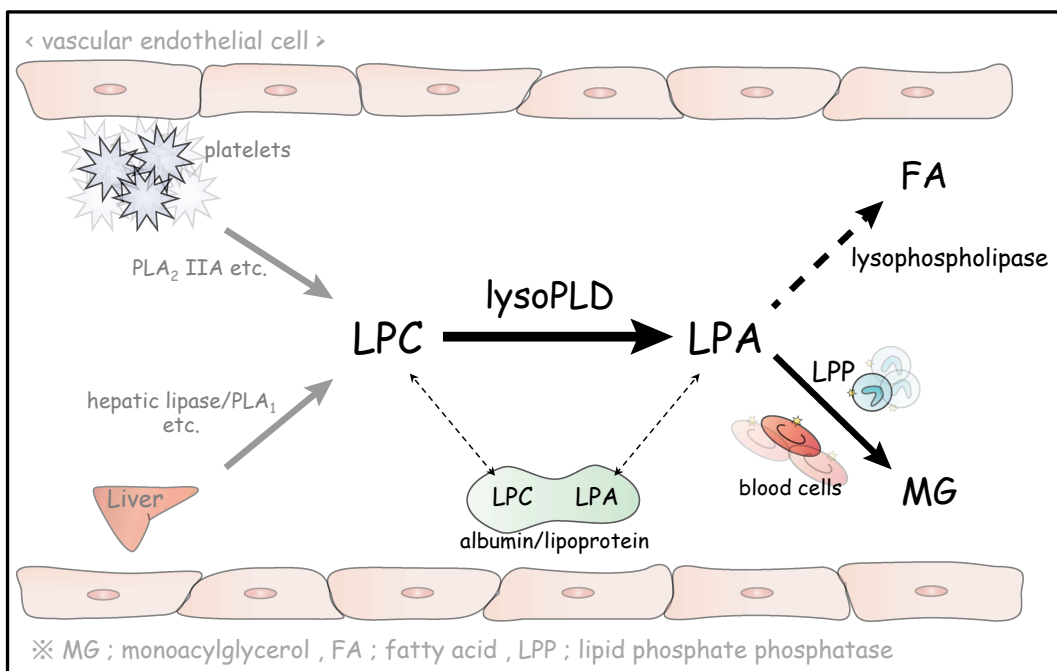
## 第 2 節・結果

### 2-1. マウス血漿中の LPA および S1P 濃度の定量的解析

アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて皮膚炎の発症に伴い LPA の循環レベルが変動するかを調べるため、皮膚炎発症前の 5 週齢および発症後の 14 週齢以降 (3-5 ヶ月齢) のモデルマウスから血漿を調製し、LPA 濃度を測定した。また、モデルマウスと週齢を揃えるためにコントロールマウスの BALB/c マウスも 5 週齢および 14 週齢以降のものを試験に供した。皮膚炎発症前の 5 週齢の時点ではコントロールマウスと NOA マウス間で血漿 LPA 濃度に差は見られなかったが (Fig. 17A)、加齢に伴う皮膚炎の発症で NOA マウス血漿 LPA 濃度はコントロールマウスと比較し有意に高値となった (Fig. 17B)。LC-MS/MS 解析から、16:1、18:2、20:5 および 22:6 の LPA 分子種が 14 週齢以降のコントロールマウスと比較し NOA マウスで有意に高値であることが明らかになった (Fig. 17C)。一方で、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスの血漿 LPA 濃度はコントロールマウスより有意に低値であった (Fig. 17B, C)。S1P は、LPA と共に 5 種以上の受容体が同定されている生理学的に重要なリゾリン脂質メディエーターであり、アトピー性皮膚炎の発症に伴い循環レベルが変動し病態生理学的に働く可能性は充分にある。そこで LPA と同様に血漿を調製し、S1P 濃度を測定した。皮膚炎を発症した NOA マウスと同週齢のコントロールマウス間で S1P 濃度に差は認められなかったが、dihydro-S1P の濃度はコントロールマウスに比べ NOA マウスで有意に低値であった (Fig. 17D)。また、NC/Nga マウスの血漿中 S1P、dihydro-S1P 濃度はコントロールマウスと比べて有意に低かった (Fig. 17D)。



**Figure 17** Plasma levels of LPAs, S1P, and dihydro-S1P in mice. **A:** Total plasma levels of LPA in 5-week-old WT (n=9) and NOA (n=9) mice. **B:** Total plasma levels of LPA in aged (>14 weeks old) WT (n=3), NOA (n=6), and NC/Nga (n=8) mice. **C:** Plasma levels of individual LPAs in aged (>14 weeks old) WT (n=3), NOA (n=6), and NC/Nga (n=8) mice. **D:** Plasma levels of S1P and dihydro-S1P in aged (>14 weeks old) WT (n=3), NOA (n=6), and NC/Nga (n=8) mice. Data are means $\pm$ SE. \* $P$  < 0.05 compared to aged-matched WT mice.



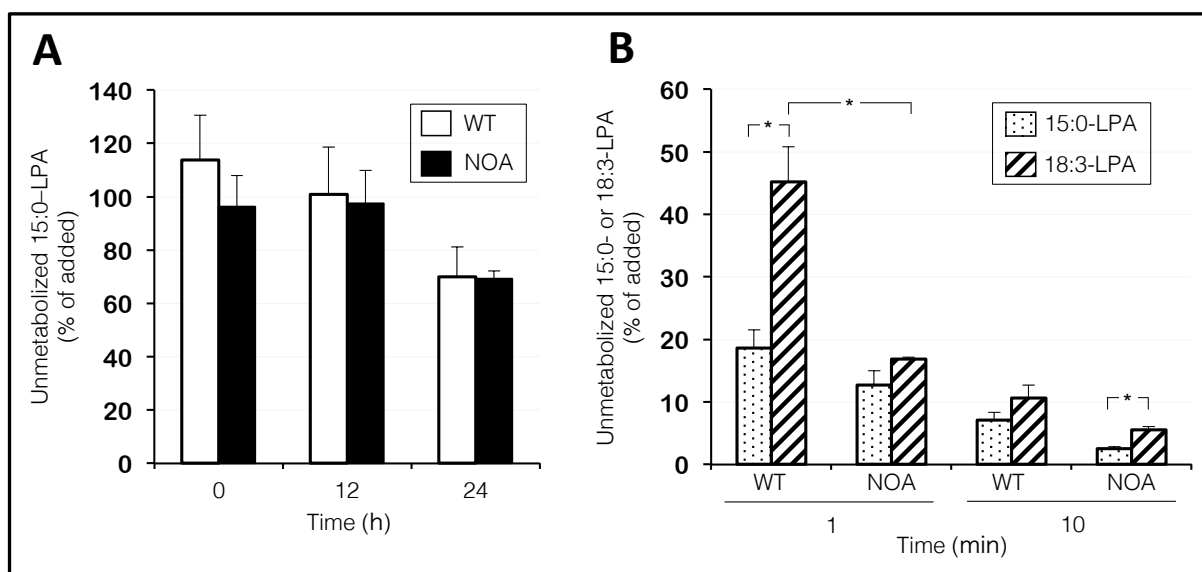
**Figure 18** Metabolic pathways for LPA in blood circulation



マウス循環血液中において LPA は通常 5 分程度の短い半減時間で消失することから、速やかに種々の LPA 分解酵素により分解されると考えられる[92, 93]。しかし、持続的な LPA 合成系との均衡により、マウスでは血漿 LPA 濃度は数  $\mu\text{M}$  と極微量の濃度に維持されている (Fig. 18)。続いて著者は、NOA マウスで認められた皮膚炎発症に伴う循環 LPA レベルの増加が、分子論的にどのような機序でもたらされているのかを明らかにすることを目指し、LPA 代謝経路について詳細な解析を行った。

## 2-2. マウス血液中の LPA 分解活性

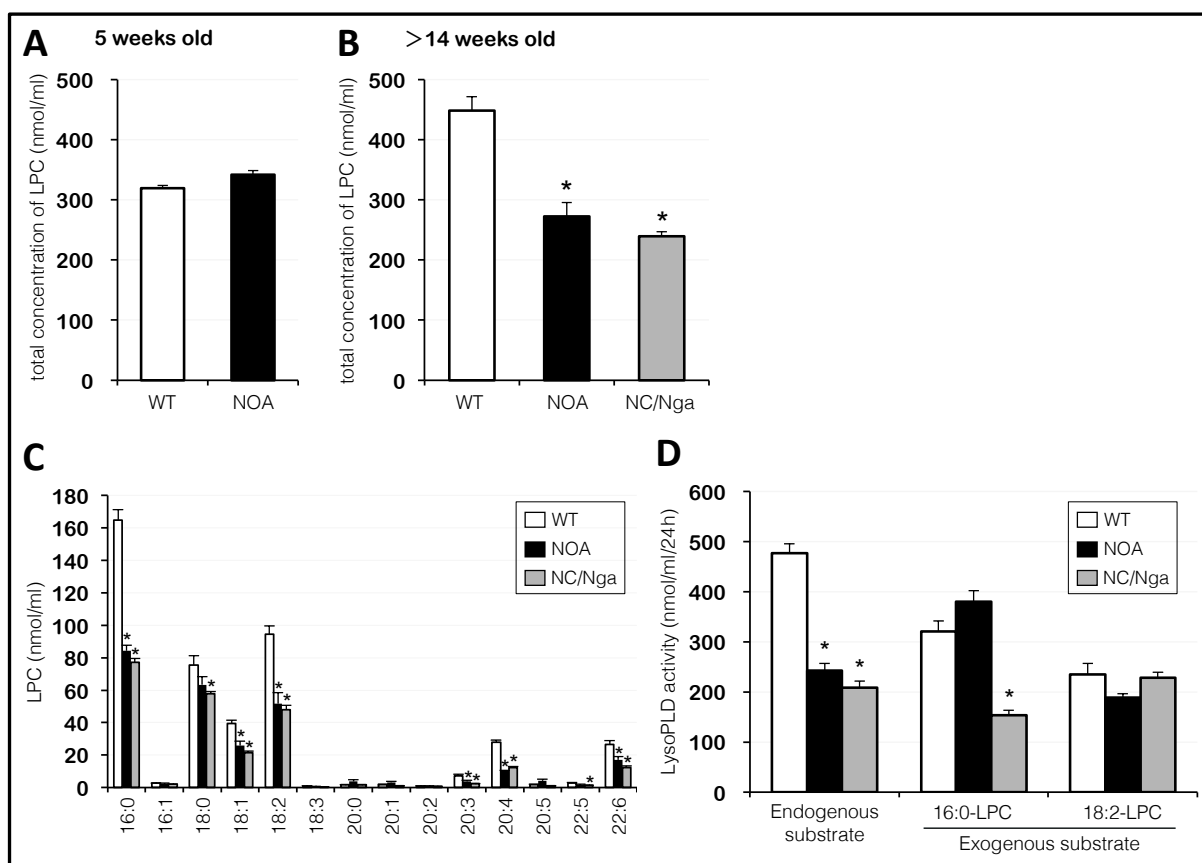
奇数鎖の脂肪酸を含有する 15:0-LPA および多価不飽和脂肪酸を含有する 18:3-LPA はマウス循環血液中にほとんど存在しないため、外因的に加えた量を 100%とし、インキュベートに伴うその代謝率を LPA 分解活性として表示した。Fig. 19-A は LPA を脂肪酸とグリセロール-3-リン酸に分解する可溶型のリゾホスホリパーゼ活性を、Fig. 19-B は LPA をモノアシルグリセロールとリン酸に分解する ecto 型の LPP 活性を解析したものである。15:0-LPA に対するリゾホスホリパーゼ活性はコントロールマウスと NOA マウス間で差がなかった (Fig. 19A)。予想外なことに、血液中の LPP 活性はコントロールマウスと比べ NOA マウスで有意に高値であった (Fig. 19B)。



**Figure 19** LPA-degrading enzyme activities in mouse blood and plasma. **A:** Mouse plasma was incubated with 15:0-LPA (2  $\mu\text{M}$ ) at 37°C for 12 or 24 h. LPL activity was determined by measuring unmetabolized 15:0-LPA after incubation. **B:** Mouse blood was incubated with 15:0- or 18:3-LPA (final 0.06 mM) at 37°C for 1 or 10 min. LPP activity was determined by measuring unmetabolized 15:0- or 18:3-LPA after incubation. Data are means $\pm$ SE of triplicate determinations. \* $P < 0.05$ .

## 2-3. マウス血漿中の LPA 産生活性

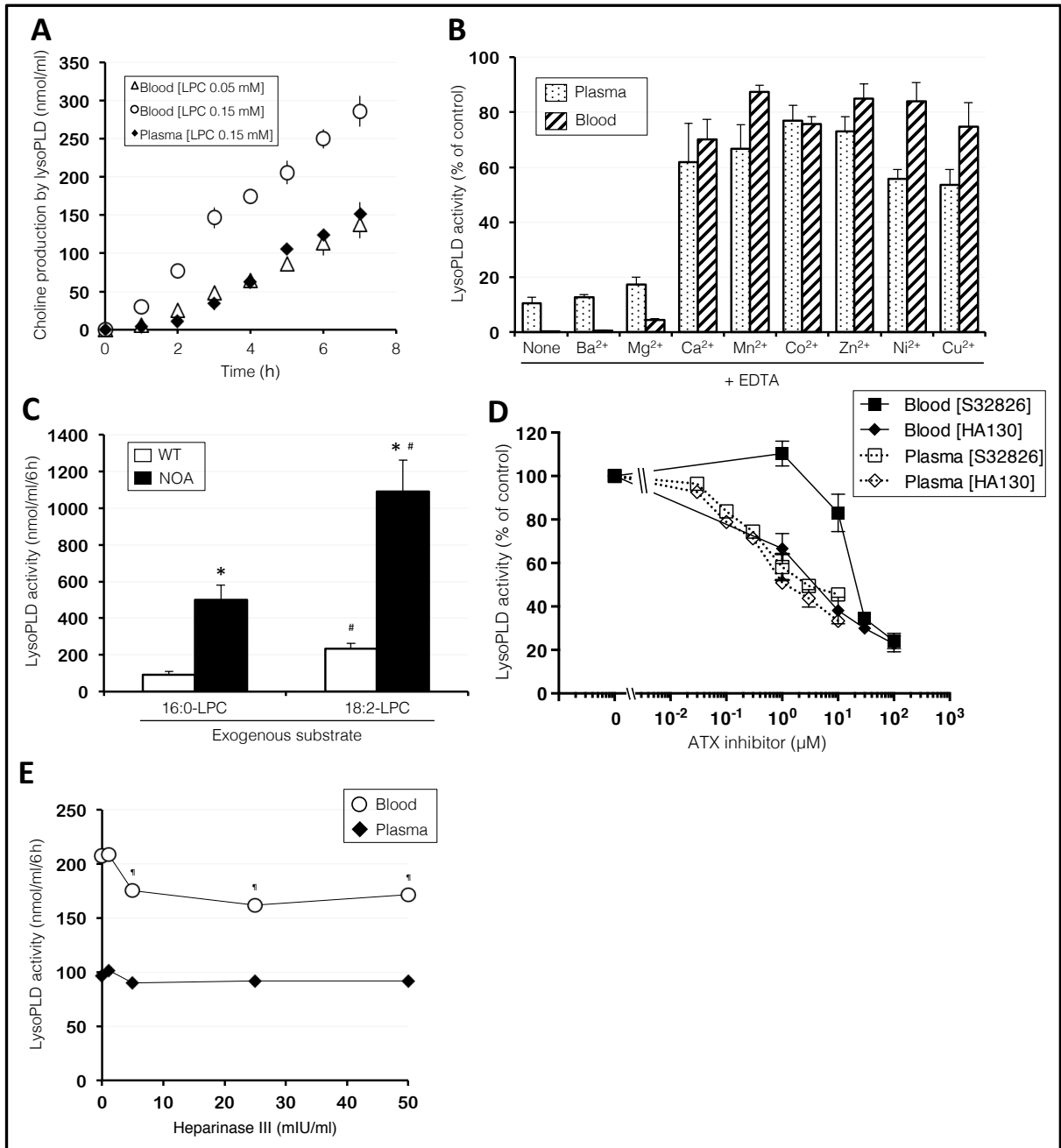
NOA マウスでは皮膚炎発症に伴い血漿 LPC レベルは増加した。しかし、NOA マウス血液中の LPC 分解活性はコントロールマウスと比較し高値であった。そこで次に LPC 産生経路について調べた。まず LPC の主要な前駆体である血漿 LPC レベルを LC-MS/MS により定量した。皮膚炎発症前の 5 週齢の時点ではコントロールマウスと NOA マウス間で血漿 LPC 濃度に差は認められなかったが (Fig. 20A)、加齢に伴う皮膚炎の発症で NOA マウス血漿 LPC 濃度はコントロールマウスと比較し有意に低値となった (Fig. 20B)。LC-MS/MS 解析から、16:0、18:1、18:2、20:3、20:4 および 22:6 の LPC 分子種がコントロールマウスと比較し NOA マウスで有意に低値であることが明らかになった (Fig. 20C)。同様な変動は皮膚炎を発症した NC/Nga マウスにおいても認められた (Fig. 20B, C)。これらの血漿 LPC 濃度の変動結果と一致し、内因的に血漿に存在する基質からのコリン産生活性はコントロールマウスと比べ NOA と NC/Nga の両モデルマウスで有意に低値であった (Fig. 20D)。しかしながらコントロールマウスと NOA マウス間で、外因的にアルブミンに吸着させて加えた基質 (16:0-LPC あるいは 18:2-LPC) に対する lysoPLD 活性には差は見られなかった (Fig. 20D)。



**Figure 20** LC-MS/MS of LPC and lysoPLD activity measurement of mouse plasma. **A:** Total plasma levels of LPC in 5-week-old WT (n=9) and NOA (n=9) mice. **B:** Total plasma levels of LPC in aged (>14 weeks old) WT (n=3), NOA (n=6), and NC/Nga (n=8) mice. **C:** Plasma levels of molecular species of LPC in aged (>14 weeks old) WT (n=3), NOA (n=6), and NC/Nga (n=8) mice were measured by LC-MS/MS. **D:** LysoPLD activity in plasma of aged (>14 weeks old) WT (n=6), NOA (n=5), and NC/Nga (n=8) mice was measured as choline-releasing activity of soluble ATX upon incubation of diluted plasma with or without exogenous LPC. Data are means±SE. \**P* < 0.05 compared to aged-matched WT mice.

## 2-4. マウス血液中の膜結合型 ATX による LPA 産生活性

ATX は白色脂肪組織や高内皮細胞 (HEC : high endothelial cell) から分泌型タンパク質として血液中に分泌されている[44, 45, 94, 95]。近年、ATX の結晶構造解析が行われ、触媒ドメインの近くに疎水性チャネルが存在し LPA を結合すること、およびソマトメジン様ドメインが平面構造をとることが明らかにされた[96, 97]。加えて、ATX がソマトメジン様ドメインを介して細胞表面分子であるインテグリンやヘパラン硫酸と結合しうることが相次いで報告された[45, 98-100]。これらの報告は、ATX のソマトメジン様ドメインがインテグリンやヘパラン硫酸と会合し、LPA を効率的に標的細胞表面受容体に放出している可能性を示唆する。そこで次に著者は ATX が血液細胞と何らかの細胞表面分子を介して会合し膜結合型 lysoPLD として機能しているかを検討した。まずコントロールマウスよりヘパリン処理した血漿および血液を調製し、lysoPLD 活性を測定した。外因性 18:2-LPC に対する lysoPLD 活性は、血漿と比べ血液を試料として用いることで有意に高値となった (Fig. 21A)。当研究室は以前 ATX の金属結合酵素としての性質について、EDTA を添加し内在性 2 価カチオンを捕捉することでラット血漿 lysoPLD 活性が阻害されること、および EDTA とある種の 2 価カチオンを共に添加すると、添加した金属イオンあるいは EDTA による捕捉から逃れた金属イオンが ATX と結合し EDTA の lysoPLD 活性阻害作用が解消されることを明らかにした[101]。コントロールマウスより調製したヘパリン処理血漿および血液に EDTA を添加すると、どちらの試料でも lysoPLD 活性は大幅に阻害された (Fig. 21B)。EDTA と  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  を共存させると、コントロールマウスより調製した血漿、血液の両試料に共通して EDTA による酵素活性の抑制は解消された (Fig. 21B)。こうした 2 価カチオン要求性は、以前ヒト血漿およびウシ胎児血清 lysoPLD で報告された性質と同様であった[101, 102]。外因性 16:0-LPC あるいは 18:2-LPC に対する NOA マウス血液 lysoPLD 活性はコントロールマウスと比較し有意に高値であった (Fig. 21C)。加えてコントロール、NOA マウス両者で、外因的に加えた 18:2-LPC に対する血液 lysoPLD 活性は 16:0-LPC に対するものより高値であった (Fig. 21C)。Ferry ら[103]および Albers ら[72]により見出された ATX 特異的阻害剤を血漿あるいは血液に添加すると、両試料に共通して阻害剤の容量依存的に lysoPLD 活性は減弱した (Fig. 21D)。コントロールマウスより調製したヘパリン処理血液にヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリナーゼⅢを添加すると、lysoPLD 活性は有意に減弱した (Fig. 21E)。一方、ヘパリン処理血漿 lysoPLD ではヘパリナーゼⅢ処理の影響は見られなかった (Fig. 21E)。



**Figure 21** Characterization of blood cell-associated lysoPLD activity due to ATX. **A:** Time courses of choline release due to the lysoPLD activities of blood and plasma from WT mice were measured at the indicated times during incubation with 0.05 mM 18:2-LPC (triangle) or 0.15 mM 18:2-LPC (circle and filled diamond). **B:** Effect of co-addition of an equimolar amount of divalent cation with EDTA (final 0.75 mM) on lysoPLD activity of diluted plasma or blood from WT mice toward 0.15 mM 18:2-LPC for 6 h. Values are relative to those without EDTA and divalent cation, set as 100%. **C:** LysoPLD activities of blood from WT and NOA mice were measured after incubating diluted blood with 0.15 mM 16:0- or 18:2-LPC for 6 h at 37°C. **D:** LysoPLD activities of plasma (empty symbols) or blood samples (filled symbols) from WT mice were measured after incubation with 0.15 mM 18:2-LPC in the presence of various concentrations of S32826 (square) or HA130 (diamond) for 6 h at 37°C. Values are relative to those of with vehicle (DMSO) alone, set as 100%. **E:** LysoPLD activities of plasma or blood samples from WT mice were measured after incubation with 0.15 mM 18:2-LPC in the presence of indicated concentrations of heparinase III (final concentration of the assay mixture) for 6 h at 37°C. Plasma or blood samples were predigested with various concentrations of heparinase III in saline for 15 min at 37°C before assay for lysoPLD activity. Data are means±SD of triplicate determinations. \**P*

<0.05 vs. WT, <sup>#</sup>*P* <0.05 vs. 16:0-LPC, <sup>¶</sup>*P* <0.05 vs. 0 mIU/ml heparinase III.

続いて5週齢および14週齢以降のNOAおよびコントロールマウスの血液性状解析を行い、マウス循環血液中でATXと会合しうる血液細胞型の検討を行った。5週齢の時点でNOAマウスの末梢血白血球数は、コントロールマウスより22%ほど多かった (Table 4)。この差はNOAマウスの皮膚炎発症に伴い増大し、14週齢以降ではNOAマウスの末梢血白血球数はコントロールマウスのものと比較し4倍ほど高値となった (Table 4)。加えて末梢血の血小板数も5週齢の時点で41%、14週齢以降で79%ほどNOAマウスの方がコントロールマウスより高値であった (Table 4)。血小板にATXが会合して機能しているかを検討するため、多血小板血漿 (PRP, platelet-rich plasma) を調製した。PRP中の血小板数はNOAマウスの方がコントロールマウスより114%ほど高値であったが、コントロール、NOAマウス間においてlysoPLD活性に差は認められなかった (Table 4)。

	WT		NOA	
	5 weeks old	>14 weeks old	5 weeks old	>14 weeks old
<b>Blood</b>				
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	84.6 $\pm$ 10.7	40.2 $\pm$ 7.2 <sup>†</sup>	103.0 $\pm$ 11.7 <sup>*</sup>	158.3 $\pm$ 39.5 <sup>*,†</sup>
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	1032.6 $\pm$ 40.1	1093.8 $\pm$ 59.9	985.8 $\pm$ 44.1	1072.7 $\pm$ 41.5 <sup>†</sup>
Hb (g/dl)	15.6 $\pm$ 0.68	16.6 $\pm$ 0.64	15.42 $\pm$ 0.57	14.6 $\pm$ 0.76 <sup>*</sup>
Hct (%)	55.3 $\pm$ 2.3	55.6 $\pm$ 2.7	52.34 $\pm$ 2.0	51.0 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup>
MCV (fL)	53.6 $\pm$ 0.94	50.8 $\pm$ 0.76 <sup>†</sup>	53.12 $\pm$ 0.77	47.6 $\pm$ 1.4 <sup>*,†</sup>
MCH (pg)	15.2 $\pm$ 0.53	15.2 $\pm$ 0.23	15.64 $\pm$ 0.38	13.7 $\pm$ 0.55 <sup>*,†</sup>
MCHC (g/dl)	28.3 $\pm$ 1.3	29.9 $\pm$ 0.40 <sup>†</sup>	29.46 $\pm$ 0.62	28.7 $\pm$ 0.68 <sup>*</sup>
Plat ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	80.8 $\pm$ 5.9	104.2 $\pm$ 9.4 <sup>†</sup>	114.2 $\pm$ 7.6 <sup>*</sup>	186.7 $\pm$ 3.2 <sup>*,†</sup>
<b>PRP</b>				
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	ND <sup>‡</sup>	0.3 $\pm$ 0.14	ND	0.13 $\pm$ 0.12
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	ND	3.0 $\pm$ 1.4	ND	2.0 $\pm$ 0.0
Plat ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	ND	7.9 $\pm$ 1.6	ND	16.9 $\pm$ 10.4
LysoPLD activity (nmol/ml/6h)	ND	437.6 $\pm$ 64.0	ND	433.9 $\pm$ 88.0

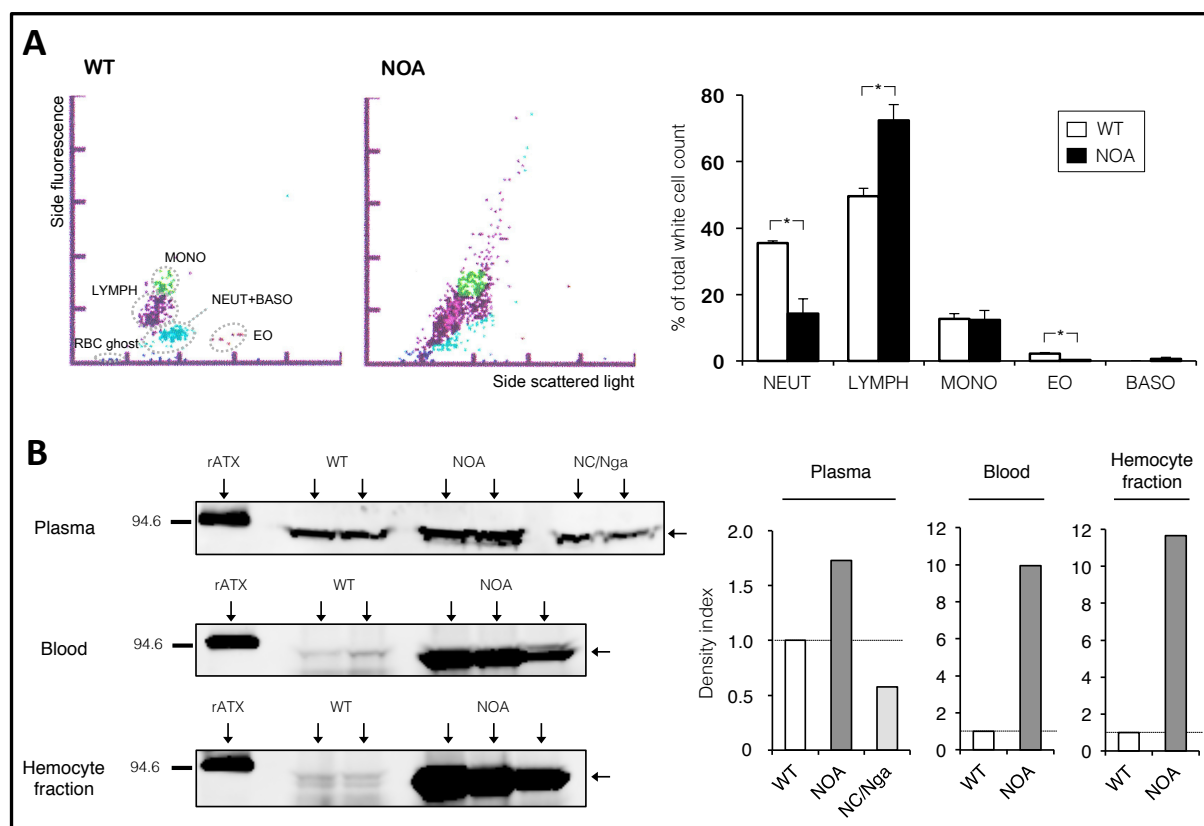
<sup>\*</sup> *P* < 0.05 compared to aged-matched WT mice.

<sup>†</sup> *P* < 0.05 compared to strain-matched 5w mice.

<sup>‡</sup> ND, not determined.

**Table 4** Blood cell composition and lysoPLD activity of mouse PRP. Cells in blood and PRP were counted using Celltac- $\alpha$  MEK-6358 (Nihon Kohden) and Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corp.) cell counters, respectively. LysoPLD activity in the PRP sample was assessed after incubation with 0.15 mM 18:2-LPC dispersed in BSA-saline buffer for 6 h at 37°C. Data are means $\pm$ SE of at least three separate experiments. The abbreviations are: WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; Plat, platelet.

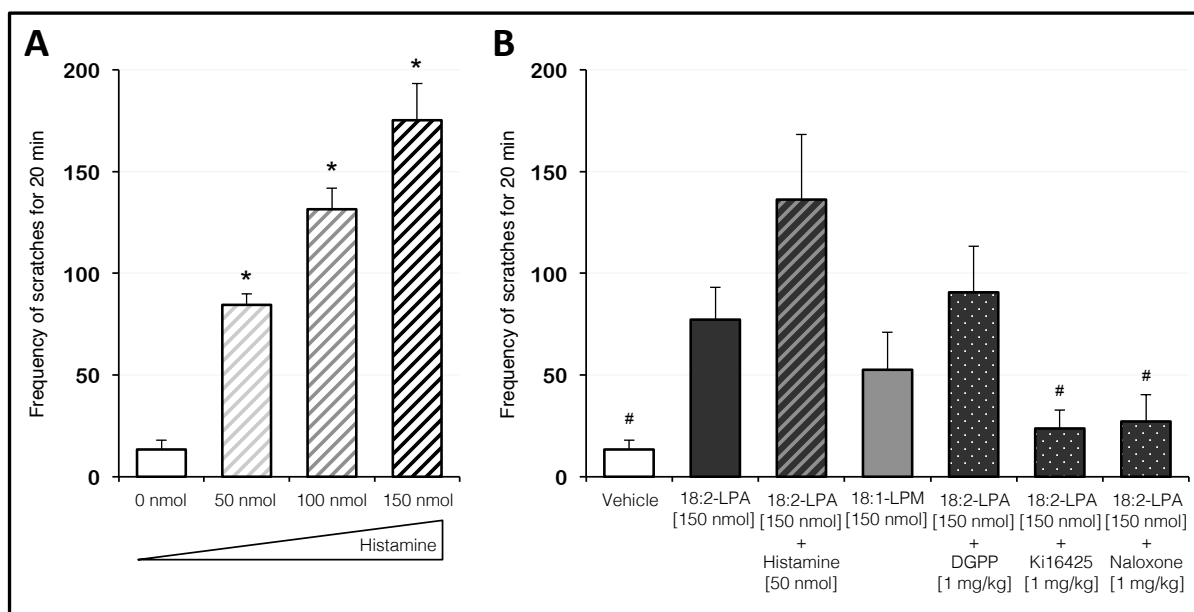
続いて14週齢以降のNOAおよびコントロールマウスを対象として白血球の亜集団解析を行った。Table 4の結果と同様にNOAマウスの末梢白血球数はコントロールマウスと比べて高値であった (Fig. 22A)。加えてNOAマウスでは白血球の亜集団中に占めるリンパ球の比率がコントロールマウスと比べて有意に高値であった (Fig. 22A)。続いて14週齢以降のNOAおよびコントロールマウスから血漿、血液および血液細胞画分を調製し、抗ATXモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによりATXの抗原レベルを解析した。lysoPLD活性の結果と同様に、NOAマウス血液および血液細胞画分ではコントロールマウスと比較し有意に高値なATX抗原レベルを認めた (Fig. 22B)。



**Figure 22** Lymphocytes are a potential target for binding with ATX in the density of NOA mouse circulation. **A:** Representative 4-DIFF scattergrams of age-matched WT and NOA mice (>14 weeks old). Right bar chart: subpopulations of WBC from blood of age-matched WT and NOA mice (>14 weeks old). Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corp.) was used for experiments. Data are means $\pm$ SE of 4 mice/group. \* $P$  <0.01 vs. WT. The abbreviations are: NEUT, neutrophil; LYMPH, lymphocyte; MONO, monocyte; EO, eosinophil; BASO, basophil. **B:** Western blotting of ATX protein in 0.003 ml each of plasma, blood, and hemocyte fraction of indicated strains was performed with anti-ATX antibody. Right bar chart shows the mean of band intensity ratios between WT and NOA (or NC/Nga) mice. Values are relative to those of WT, set as 1. The signal intensity of each band was quantified using the software Multi Gauge version 3.2 (Fujifilm). Human recombinant ATX (rATX) was used as a positive control.

## 2-5. LPAの起痒メカニズムの解析

雌性 ICR マウスの後背部皮内にヒスタミンを投与すると容量依存的に後肢による掻き動作が観察された (Fig. 23A)。LPA の皮内投与 (150 nmol/site) によっても掻き動作は誘発されたが、その強度は同容量のヒスタミン投与によって誘発されるものより低値であった。LPA (150 nmol) とヒスタミン (50 nmol) の併用投与は相加的に掻き動作を誘発した (Fig. 23A, B)。LPA 受容体のパンアゴニストとして知られる LPM[104]の皮内投与(150 nmol/site) は有意に掻き動作を誘発した (Fig. 23B)。LPM は LPP による脱リン酸化反応に対して安定であるが [104]、LPM 誘発性の掻き動作は 20 分以内に鎮静し、こうした経時的な反応様式は LPA とヒスタミン投与の際に認められた様式と同様であった。LPA 誘発性掻き動作の強度は、LPA 受容体 1 と 3 の選択的な阻害剤である Ki16425 処理で減弱したが、LPA 受容体 3 の選択的阻害剤である DGPP (8:0) 処理では変動しなかった (Fig. 23B)。また、オピオイド  $\mu$  受容体のアンタゴニストであるナロキソンの皮下投与は、LPA 誘発性掻き動作の強度を有意に減弱させた (Fig. 23B)。

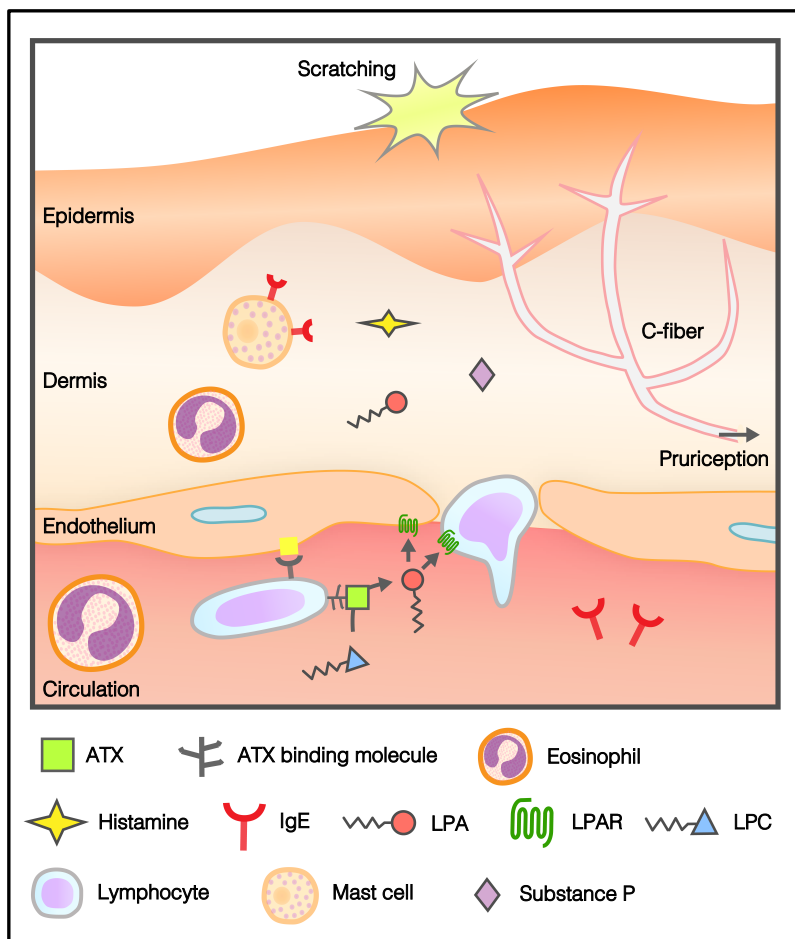


**Figure 23** Itch-scratch responses following intradermal injection of histamine, LPA, and LPM. A pruritic agent was administered intradermally into the rostral region of the back. The number of itch-scratch responses was observed and recorded for 20 min. **A:** Dose-dependence of the scratching induced by histamine (50, 100, and 150 nmol/site). **B:** Itch-scratch response induced by 18:2-LPA (150 nmol/site), 18:2-LPA (150 nmol/site) plus histamine (50 nmol/site), or 18:1-LPM (150 nmol/site) in the combination of either DGPP (1 mg/kg) or Ki16425 (1 mg/kg) or Naloxone (1 mg/kg). Data are means $\pm$ SE of 3–6 mice/group. \* $P$  < 0.05 vs. histamine (0 nmol/site), # $P$  < 0.05 vs. 18:2-LPA (150 nmol/site).

### 第 3 節・考察

本研究では LPA の起痒メカニズムの解明を試みた。以前の報告と一致し[48, 88]、ICR マウス後背部皮内への LPA 投与は有意に後肢による掻き動作を誘発した。この LPA の起痒作用は LPA1 受容体とオピオイド  $\mu$  受容体の活性化を介していた。マウス足蹠への LPA 投与は、末梢神経終末からのサブスタンス P 放出を介し、侵害受容を促進させることが知られている[105]。ヒトの表皮および真皮のケラチノサイトや無髄の末梢神経繊維で、オピオイド  $\mu$  受容体の発現が確認されている[106]。オピオイド  $\mu$  受容体の阻害剤は、サブスタンス P 誘導性マウスの掻き動作を減弱させ[86]、アトピー性皮膚炎患者や胆汁うっ滞症患者の掻痒を軽減させる[107]。末梢でのオピオイドを介した掻痒のメカニズムはいまだ不明な点も多いが、これらの知見は、LPA がオピオイド経路を介して皮膚の掻痒神経繊維を活性化させるという本研究結果を支持する。興味深いことに Kim らはオピオイド  $\mu$  受容体の阻害剤が、スフィンゴシルホスホリルコリン誘導性のマウス掻き動作を減弱させることを報告した[108]。また Hashimoto らはヒスタミン H1 受容体阻害剤（ケトチフェン）とカプサイシンが、LPA 誘導性マウスの掻き動作を減弱させることを報告している[88]。本研究で著者らは LPA が内因的にヒスタミンの分泌に影響を及ぼすかの検討は行っていないが、LPA とヒスタミンの併用投与で認められた掻き動作の相加作用は完全ではなく、LPA の作用の一部は皮膚局所でのヒスタミン分泌を介したものかもしれない。ケトチフェンにはヒスタミン拮抗作用の他に、マスト細胞の安定化[109]や白血球動員阻害作用[110]が報告されており、今後 LPA-ヒスタミン経路に関してはさらなる検討が必要だろう。近年、カプサイシン受容体である TRPV1 (transient receptor potential protein V1) チャネルと LPA が直接的に相互作用する可能性が示唆された[111]。掻痒受容神経上に LPA 受容体は存在するのだろうか、今後の課題である。本研究では LPA 投与による急性の起痒誘発メカニズムの解明を試みた。慢性的な皮膚炎を伴った NOA マウスにおいて LPA は、他の神経調節物質（ヒスタミン、サブスタンス P、神経成長因子）とクロストークし起搔、表皮性の神経繊維出芽、過感受性などの悪循環を生み出し、病態形成に関与しているのかもしれない (Fig. 24)。





**Figure 24** A hypothetical scheme of the role of local LPA-ATX coupling during pruriception in NOA mice. Blood cell-associated ATX elevates the local level of LPA in the blood vessel lumen, which may cause endothelial hyperpermeability and facilitates the migration of WBC into dermal inflammatory areas. Subsequently, the resultant 'sinking' of blood-borne LPA into the dermal tissues serves as a peripheral itch mediator. We speculate that residential and infiltrating immune cells release itch mediators (LPA, histamine, substance P) toward receptors on c-fibers in dermal allergic inflammation of NOA mice.

Kremer らは皮膚掻痒症を伴う胆汁うっ滞症患者で血清 LPA 濃度と ATX 抗原量が増加していることを見出した[48]。この報告は、アトピー性皮膚炎の掻痒症において LPA が全身性のメディエーターとして病態生理学的に役割を果たしているとの筆者の仮説を支持する。NOA マウスでは循環 LPA レベルは高値であったが、血漿 lysoPLD 活性はコントロールマウスと差がなく、血液 lysoPLD 活性が増加していた。この結果から ATX が血液細胞に結合して作用する可能性が考えられた。血液 lysoPLD 活性の 2 価カチオン要求性は血漿と同様であり、両試料に共通して lysoPLD 活性は添加した ATX 阻害剤の用量に依存して減弱した。これらの結果はマウス血液中で ATX が血液細胞に会合し lysoPLD として機能することを示唆する。ヘパリナーゼⅢ処置で血液 lysoPLD 活性が有意に減弱することが確認され、ATX は血液細胞とヘパラン硫酸を介して会合していることがわかった。近年、ATX の結晶構造解析から、疎水性チャネルが酵素の活性部位から出口部位へ LPA を通過させる導管として機能していることが明らかになった[96, 97]。出口部位は ATX の細胞性結合パートナーの界面であると想定され、疎水性チャネルはパートナー細胞のシグナル伝達受容体の近くへ LPA を輸送するシャトル機構の基盤とな

っている[96, 97]。つまりヘパラン硫酸を介して会合した血液細胞-ATX 複合体は、LPA 受容体への LPA 輸送を促進させ、局所的に産生された LPA が血流下で散逸性に作用するのを防ぐと共に脂質リン酸ホスファターゼなどによる分解作用から LPA を隔離していると想定される。

連鎖解析により、NOA および NC/Nga マウスの皮膚炎形成に関与する主要な原因遺伝子はそれぞれ 14 番染色体と 9 番染色体に位置していることが明らかにされた[112, 113]。NOA マウスでは 7 番染色体と 13 番染色体に二つの変異遺伝子が位置している[114]。これまでにアトピー性皮膚炎の原因遺伝子同定を目指した研究が数多く行われてきたが、“atopy gene”は明らかになっていない[115]。皮膚病変を発症した NOA マウス血漿 LPA 濃度はコントロールマウスと比べ高値であったが、NC/Nga マウスではこうした変動はみられなかった。この結果の相違の理由は今のところわからないが、NOA マウスでは部位に限定なく全身性に皮膚炎がみられるのに対し NC/Nga マウスは耳介と頭部を中心に皮膚炎を発症する、つまり、この相違は LPA の循環性のメディエーターとしての役割を強調しているのかもしれない。また、NC/Nga マウスは NOA マウスとは異なりコンベンショナル環境下でのみ皮膚炎を発症することが知られており[116]、環境アレルギーの影響で相違が生じている可能性もある。

高内皮細静脈 (HEV, high endothelial venule) に高発現した ATX は、局所的な LPA 産生を亢進させ、リンパ球の血中から 2 次リンパ器官へのホーミングを促進させる[45, 117]。ATX は HEV から内腔側に分泌され  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンを介してリンパ球と会合する[45]。また、HEV を通過し血管外へ浸潤するナイーブなリンパ球の移動は、ATX 阻害剤処置で有意に緩徐になる[118]。慢性炎症部位の血管は ATX に応答性の HEV 様の血管に分化することが知られており[117, 119]、炎症に伴うこうした血管の形態的および機能的な変化は NOA マウス血液中の ATX 抗原レベルに影響を及ぼすかもしれない。今のところマウス血液中で ATX がどの細胞集団と会合しているのか明確ではないが、NOA マウス脾臓において platelet factor 4 (CXCL4)、eotaxin (CCL11)、regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) の mRNA レベルがコントロールの BALB/c マウスと比較し高値であることが報告されており[120]、リンパ球だけでなく好酸球も ATX と会合するかもしれない。

アトピー性皮膚炎の炎症部では多数のリンパ球、好酸球の浸潤およびケラチノサイトや肥満細胞の集積がみられ、これらの細胞から放出された起痒メディエーターが C 繊維を刺激することで掻痒が誘発される[121]。LPA 刺激は、血漿滲出を亢進させ[47]ヒト臍帯静脈内皮細胞の細胞接着分子-1 (ICAM-1) 発現を増加させることが知られている[122]。今のところ NOA マウス血液中の ATX 発現を増加させるシグナル伝達機構の詳細はわからないが、NOA マウスで認められた循環 LPA レベル高値は、血漿漏出や炎症細胞の病変部への異常な取り込みを誘発させているのかもしれない。ヒト消化管粘膜下の結合組織に存在する肥満細胞は豊富に ATX を発現することが報告されており[123]、アトピー性皮膚炎の炎症部に存在する肥満細胞で ATX 発現が認められれば、LPA の産生亢進に次ぐ掻痒誘発につながる可能性があり、今後の課題である。

本研究では皮膚炎を発症した NOA マウスで循環 LPA レベルが高値であることを示し、それは血液中の ATX 発現増加とヘパラン硫酸を介した ATX-血液細胞間の会合により担われていることを明らかにした。筆者は、全身性のメディエーターである LPA の慢性的な濃度異常がアトピー性皮膚炎という皮膚疾患形成に病態生理学的に関与していると考えている。この考えは、住血吸虫由来 LPC の腹腔内投与が Toll 様受容体 2 の活性化を介し、腹腔への eotaxin/CCL11 や好酸球の動員を誘発する[124]という事実からも支持される。本研究により、循環血液中 LPA の量的および質的バランスのコントロールがアトピー性皮膚炎の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

## 総括

アトピー性皮膚炎の発症率は、感染機会の多い途上国では少なく、衛生完備された先進国において増加していることが報告されている[2]。この現象は、Strachan らの提唱する hygiene 仮説（衛生仮説）により一部が説明できるだろう[125]。つまり、感染機会の多い地域に住む人々は、感染防御機構としての免疫機能が高く、皮膚に侵入した異物を搔破によらない免疫防御機構により排除できる。しかし、衛生環境の整った地域に住む人々は感染に対する免疫機能が低下しており、皮膚に浸入する異物を皮膚免疫機構では排除できない。そこで、生体は搔痒誘発因子を発現して搔痒を惹起し、皮膚を損傷するほどの激しい搔破行動を誘発し、皮膚の免疫機構では排除できない表皮感染に対し最終的な防御機構を駆動する。その結果、「アトピー性皮膚炎」という文明病が、まるで新種の疾患でもあるかのように近代化された我々の社会に出現したのかもしれない。

興味深いことに、Chen と Blaser は、子供のときにピロリ菌を獲得するとぜん息やアレルギーになりにくいことを報告している[126]。また発育の初期に、ある種の微生物にさらされると、後にそれと近縁な微生物に対するアレルギー反応が起きなくなる、といった保護効果が見られる[127, 128]。多くの先進国における抗生物質使用の拡大が、腸内細菌の構成を永久に崩してしまい、それによって寄主の免疫反応の方向を変化させてしまうのかもしれない。

アトピー性皮膚炎では、搔痒が搔破行動をもたらして皮膚を損傷することにより、さらに搔痒が増加し、強い搔破が発現する結果、炎症反応が増悪する itch-scratch-cycle と呼ばれる現象が存在し、疾患の難治化を進行させる[6]。医師の指導などにより、搔破による悪影響は患者にも認知されつつあるが、意志の力で搔破行動を止めることのできない乳児、幼児、小児および我慢できない強い搔痒に悩まされる成人患者においては、搔痒を抑制し、搔破を止めることが最大の治療効果をもたらすものと考えられる。そこで、本研究では、リゾリン脂質メディエーターである LPA (lysophosphatidic acid, リゾホスファチジン酸) がアトピー性皮膚炎の新規な搔痒誘発因子として、あるいは炎症増悪因子として働いているのではないかと仮説を立て、その仮説の検証を試みた。

アトピー性皮膚炎患者血清中の lysoPLD 活性は健常人と比べて有意に高値であり、アトピー性皮膚炎モデルマウス NOA マウスでは皮膚炎の発症に伴い循環 LPA レベルが有意に増加した。また、皮膚局所において LPA は、LPA 受容体を介し掻き動作を誘発した。これらの結果は、LPA がアトピー性皮膚炎の病態生理学的なメディエーターとして機能しているのではないかと、という筆者の仮説を強力に支持するものである。

皮膚への局所的な LPA の投与は、皮膚の再上皮化と皮膚の創傷治癒を促進するということが明らかにされており[129, 130]、本研究で得られた LPA に関する知見を、皮膚創傷治癒に働く

という全く異なった観点から考察してみるのも興味深い。一般的に、怪我をした後や手術後の創傷治癒過程において創傷部位で掻痒感が伴うことが知られており、LPA は皮膚病変の治癒に働くと共に、掻痒受容神経を刺激し掻痒を誘発しているのかもしれない。

近年、悪性腫瘍患者の病変進行、および転移を防ぐ目的で ATX 阻害剤や LPA 受容体阻害剤が開発されており[131]、LPA に関する本研究成果がアトピー性皮膚炎の新規な抗掻痒あるいは皮膚炎改善薬の開発へ繋がることを期待する。

## 参考文献

1. 古江増隆, 古川福実, 秀道広 & 竹原和彦 (2004) 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2004 改訂版, 日皮会誌. 114, 135-42.
2. Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, R., Asher, I., Beasley, R., Bjorksten, B., Burr, M., Clayton, T., Crane, J., Ellwood, P., Keil, U., Lai, C., Mallol, J., Martinez, F., Mitchell, E., Montefort, S., Pearce, N., Shah, J., Sibbald, B., Strachan, D., von Mutius, E. & Weiland, S. K. (1999) Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood, *J Allergy Clin Immunol.* 103, 125-38.
3. Esche, C., de Benedetto, A. & Beck, L. A. (2004) Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals, *Curr Allergy Asthma Rep.* 4, 276-84.
4. Wise, F. & Sulzberger, M. (1933) Year book of dermatology and syphilology, Year Book of Dermatology and Syphilology Chicago: Year Book Publishers, 38-9.
5. Paus, R., Schmelz, M., Biró, T. & Steinhoff, M. (2006) Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy, *Journal of Clinical Investigation.* 116, 1174-1186.
6. Wahlgren, C.-F. (1999) Itch and atopic dermatitis: an overview, *The Journal of dermatology.* 26, 770.
7. MacDermot, H. (1927) The Blood Vessels of the Human Skin and Their Responses, *Canadian Medical Association Journal.* 17, 1574.
8. Heyer, G. & Hornstein, O. (1999) Recent studies of cutaneous nociception in atopic and non-atopic subjects, *The Journal of dermatology.* 26, 77-86.
9. Weidner, C., Klede, M., Rukwied, R., Lischetzki, G., Neisius, U., Skov, P. S., Petersen, L. J. & Schmelz, M. (2000) Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin—a microdialysis study, *Journal of investigative dermatology.* 115, 1015-1020.
10. Fantini, F., Pincelli, C., Massimi, P. & Giannetti, A. (1990) Neuropeptide - like immunoreactivity in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis, *British Journal of Dermatology.* 122, 838-838.
11. Fjellner, B. & Hägermark, Ö. (1984) The influence of the opiate antagonist naloxone on experimental pruritus, *Acta dermato-venereologica.* 64, 73.
12. Epstein, F. H. & Stein, C. (1995) The control of pain in peripheral tissue by opioids, *New England Journal of Medicine.* 332, 1685-1690.
13. Summerfield, J. A. (1981) Pain, itch and endorphins, *British Journal of Dermatology.* 105, 725-726.
14. Bergasa, N. V., Alling, D. W., Talbot, T. L., Swain, M. G., Yurdaydin, C., Turner, M. L., Schmitt, J. M., Walker, E. C. & Jones, E. A. (1995) Effects of naloxone infusions in patients

with the pruritus of cholestasis: a double-blind, randomized, controlled trial, *Annals of internal medicine*. 123, 161-167.

15. Wahlgren, C.-F., Hägermark, Ö., Linder, M. T. & Scheynius, A. (1995) Itch and inflammation induced by intradermally injected interleukin-2 in atopic dermatitis patients and healthy subjects, *Archives of dermatological research*. 287, 572-580.

16. Darsow, U., Scharein, E., Bromm, B. & Ring, J. (1997) Skin testing of the pruritogenic activity of histamine and cytokines (interleukin - 2 and tumour necrosis factor -  $\alpha$ ) at the dermal-epidermal junction, *British Journal of Dermatology*. 137, 415-417.

17. Czarnetzki, B. & Csato, M. (1989) Comparative studies of human eosinophil migration towards platelet-activating factor and leukotriene B<sub>4</sub>, *International Archives of Allergy and Immunology*. 88, 191-193.

18. Sigal, C. E., Valone, F. H., Holtzman, M. J. & Goetzel, E. J. (1987) Preferential human eosinophil chemotactic activity of the platelet-activating factor (PAF) 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (AGEPC), *Journal of clinical immunology*. 7, 179-184.

19. Järvikallio, A., Naukkarinen, A., Harvima, I., AALTO, M. L. & Horsmanheimo, M. (1997) Quantitative analysis of tryptase - and chymase - containing mast cells in atopic dermatitis and nummular eczema, *British Journal of Dermatology*. 136, 871-877.

20. Harvima, I., Naukkarinen, A., Harvima, R. & Horsmanheimo, M. (1989) Enzyme-and immunohistochemical localization of mast cell tryptase in psoriatic skin, *Archives of dermatological research*. 281, 387-391.

21. Naukkarinen, A., Harvima, I. T., AALTO, M. L. & Horsmanheimo, M. (1994) Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin, *International journal of dermatology*. 33, 361-366.

22. Ständer, S. & Steinhoff, M. (2002) Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview, *Experimental dermatology*. 11, 12-24.

23. Moolenaar, W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger, *Journal of Biological Chemistry*. 270, 12949-12952.

24. Tokumura, A. (1995) A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions, *Progress in lipid research*. 34, 151-184.

25. Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer, *Nature Reviews Cancer*. 3, 582-591.

26. van Meeteren, L. A. & Moolenaar, W. H. (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis, *Progress in lipid research*. 46, 145-160.

27. Yatomi, Y., Yamamura, S., Ruan, F. & Igarashi, Y. (1997) Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid, *Journal of Biological Chemistry*. 272, 5291-5297.

28. Idzko, M., Panther, E., Corinti, S., Morelli, A., Ferrari, D., Herouy, Y., Dichmann, S., Mockenhaupt, M., Gebicke-Haerter, P. & Di Virgilio, F. (2002) Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses, *The FASEB Journal*. 16, 625-627.
29. Birgbauer, E. & Chun, J. (2006) New developments in the biological functions of lysophospholipids, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 63, 2695-2701.
30. Chalfant, C. E. & Spiegel, S. (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling, *Journal of cell science*. 118, 4605-4612.
31. Fourcade, O., Simon, M.-F., Viodé, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournié, B., Sarda, L. & Chap, H. (1995) Secretory phospholipase A<sub>2</sub> generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells, *Cell*. 80, 919-927.
32. Sonoda, H., Aoki, J., Hiramatsu, T., Ishida, M., Bandoh, K., Nagai, Y., Taguchi, R., Inoue, K. & Arai, H. (2002) A Novel Phosphatidic Acid-selective Phospholipase A<sub>1</sub> That Produces Lysophosphatidic Acid, *Journal of Biological Chemistry*. 277, 34254-34263.
33. Hiramatsu, T., Sonoda, H., Takanezawa, Y., Morikawa, R., Ishida, M., Kasahara, K., Sanai, Y., Taguchi, R., Aoki, J. & Arai, H. (2003) Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A<sub>1</sub>s, mPA-PLA1 $\alpha$  and mPA-PLA1 $\beta$ , *Journal of Biological Chemistry*. 278, 49438-49447.
34. Tokumura, A., Miyake, M., Yoshimoto, O., Shimizu, M. & Fukuzawa, K. (1998) Metal-ion stimulation and inhibition of lysophospholipase D which generates bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma, *Lipids*. 33, 1009-1015.
35. Tokumura, A., Nishioka, Y., Yoshimoto, O., Shinomiya, J. & Fukuzawa, K. (1999) Substrate specificity of lysophospholipase D which produces bioactive lysophosphatidic acids in rat plasma, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1437, 235-245.
36. Tokumura, A., Fujimoto, H., Yoshimoto, O., Nishioka, Y., Miyake, M. & Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in incubated plasma of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats, *Life sciences*. 65, 245-253.
37. Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T. & Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients, *Biology of reproduction*. 61, 195-9.
38. Tokumura, A., Yamano, S., Aono, T. & Fukuzawa, K. (2000) Lysophosphatidic acids produced by lysophospholipase D in mammalian serum and body fluid, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 905, 347-350.
39. Okudaira, S., Yukiura, H. & Aoki, J. (2010) Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin, *Biochimie*. 92, 698-706.



40. Stracke, M., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E. & Liotta, L. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein, *Journal of Biological Chemistry*. 267, 2524-2529.
41. Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J. & Arai, H. (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid, *Journal of Biological Chemistry*. 281, 25822-25830.
42. Van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., Van Rooijen, M. A., Pradère, J. P., Pettit, T. R., Wakelam, M. J., Saulnier-Blache, J. S. & Mummery, C. L. (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development, *Molecular and cellular biology*. 26, 5015-5022.
43. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. & Fukuzawa, K. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase, *The Journal of biological chemistry*. 277, 39436-42.
44. Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Gres, S., Naime, I., Simon, M. F., Rodriguez, M., Boucher, J., Tack, I., Gesta, S., Chomar, P., Dieu, M., Raes, M., Galizzi, J. P., Valet, P., Boutin, J. A. & Saulnier-Blache, J. S. (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity, *The Journal of biological chemistry*. 278, 18162-9.
45. Kanda, H., Newton, R., Klein, R., Morita, Y., Gunn, M. D. & Rosen, S. D. (2008) Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs, *Nature immunology*. 9, 415-23.
46. Jansen, S., Andries, M., Vekemans, K., Vanbilloen, H., Verbruggen, A. & Bollen, M. (2009) Rapid clearance of the circulating metastatic factor autotaxin by the scavenger receptors of liver sinusoidal endothelial cells, *Cancer letters*. 284, 216-21.
47. Hashimoto, T., Ohata, H. & Honda, K. (2006) Lysophosphatidic Acid (LPA) Induces Plasma Exudation and Histamine Release in Mice via LPA Receptors, *Journal of Pharmacological Sciences*. 100, 82-87.
48. Kremer, A. E., Martens, J. J., Kulik, W., Rueff, F., Kuiper, E. M., van Buuren, H. R., van Erpecum, K. J., Kondrackiene, J., Prieto, J., Rust, C., Geenes, V. L., Williamson, C., Moolenaar, W. H., Beuers, U. & Oude Elferink, R. P. (2010) Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus, *Gastroenterology*. 139, 1008-18, 1018 e1.
49. Hamid, Q., Boguniewicz, M. & Leung, D. (1994) Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis, *Journal of Clinical Investigation*. 94, 870.

50. van der Heijden, F. L., Wierenga, E. A., Bos, J. D. & Kapsenberg, M. L. (1991) High Frequency of IL-4-Producing CD4<sup>+</sup> Allergen-Specific T Lymphocytes in Atopic Dermatitis Lesional Skin, *Journal of investigative dermatology*. 97, 389-394.
51. Grewe, M., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Schöpf, E., Thepen, T., Langeveld-Wildschut, A. G., Ruzicka, T. & Krutmann, J. (1998) A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *Immunology today*. 19, 359-361.
52. Schlaak, J. F., Buslau, M., Jochum, W., Hermann, E., Girndt, M., Gallati, H., zum Büschenfelde, K.-H. M. & Fleischer, B. (1994) T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset, *Journal of investigative dermatology*. 102, 145-149.
53. Uyemura, K., Yamamura, M., Fivenson, D. F., Modlin, R. L. & Nickoloff, B. J. (1993) The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response, *Journal of investigative dermatology*. 101, 701-705.
54. Guttman-Yassky, E., Nograles, K. E. & Krueger, J. G. (2011) Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—part I: clinical and pathologic concepts, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127, 1110-1118.
55. Guttman-Yassky, E., Nograles, K. E. & Krueger, J. G. (2011) Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—part II: immune cell subsets and therapeutic concepts, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127, 1420-1432.
56. Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J. A. & Bergman, R. (2007) Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis, *Journal of allergy and clinical immunology*. 119, 1210-1217.
57. de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P. G., Blokk, W., Dogan, A., Hiemstra, P. S., van de Kerkhof, P. C. & Schalkwijk, J. (2005) High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis, *Journal of investigative dermatology*. 125, 1163-1173.
58. Tokura, Y. (2010) Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis, *Journal of dermatological science*. 58, 1-7.
59. Zheng, Y., Kong, Y. & Goetzel, E. J. (2001) Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane, *The Journal of Immunology*. 166, 2317-2322.
60. Stam, J., Michiels, F., Van der Kammen, R., Moolenaar, W. & Collard, J. (1998) Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling, *The EMBO journal*. 17, 4066-4074.
61. Hashimoto, T., Yamashita, M., Ohata, H. & Momose, K. (2003) Lysophosphatidic acid enhances in vivo infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/Rho-associated protein kinase-mediated pathway, *Journal of pharmacological sciences*.

91, 8-14.

62. Zhao, Y., Tong, J., He, D., Pendyala, S., Chun, J., Sperling, A. & Natarajan, V. (2009) Role of lysophosphatidic acid receptor LPA2 in the development of allergic airway inflammation in a murine model of asthma, *Respiratory research*. 10, 114.
63. Lundequist, A. & Boyce, J. A. (2011) LPA5 is abundantly expressed by human mast cells and important for lysophosphatidic acid induced MIP-1  $\beta$  release, *PloS one*. 6, e18192.
64. Georas, S. N., Berdyshev, E., Hubbard, W., Gorshkova, I. A., Usatyuk, P. V., Saatian, B., Myers, A. C., Williams, M. A., Xiao, H. Q., Liu, M. & Natarajan, V. (2007) Lysophosphatidic acid is detectable in human bronchoalveolar lavage fluids at baseline and increased after segmental allergen challenge, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 37, 311-22.
65. Park, G. Y., Lee, Y. G., Berdyshev, E., Nyenhuis, S., Du, J., Fu, P., Gorshkova, I. A., Li, Y., Chung, S., Karpurapu, M., Deng, J., Ranjan, R., Xiao, L., Jaffe, H. A., Corbridge, S. J., Kelly, E. A., Jarjour, N. N., Chun, J., Prestwich, G. D., Kaffé, E., Ninou, I., Aidinis, V., Morris, A. J., Smyth, S. S., Ackerman, S. J., Natarajan, V. & Christman, J. W. (2013) Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation, *American journal of respiratory and critical care medicine*. 188, 928-40.
66. Tanaka, T., Ikita, K., Ashida, T., Motoyama, Y., Yamaguchi, Y. & Satouchi, K. (1996) Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, *Lipids*. 31, 1173-1178.
67. Chalvardjian, A. & Rudnicki, E. (1970) Determination of lipid phosphorus in the nanomolar range, *Analytical biochemistry*. 36, 225-226.
68. Guo, Z., Liliom, K., Fischer, D. J., Bathurst, I. C., Tomei, L. D., Kiefer, M. C. & Tigyi, G. (1996) Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 14367-14372.
69. Zaitsev, K. & Ohkura, Y. (1980) New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase, *Analytical biochemistry*. 109, 109-113.
70. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680-685.
71. Tokumura, A., Kume, T., Taira, S., Yasuda, K. & Kanzaki, H. (2009) Altered activity of lysophospholipase D, which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from women with pathological pregnancy, *Molecular human reproduction*. 15, 301-10.
72. Albers, H. M., Dong, A., van Meeteren, L. A., Egan, D. A., Sunkara, M., van Tilburg, E. W., Schuurman, K., van Tellingen, O., Morris, A. J., Smyth, S. S., Moolenaar, W. H. & Ovaa, H. (2010) Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the

- circulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 7257-62.
73. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. & Moolenaar, W. H. (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets, *Biochem J*. 291, 677-680.
  74. Bolen, A. L., Naren, A. P., Yarlagadda, S., Beranova-Giorgianni, S., Chen, L., Norman, D., Baker, D. L., Rowland, M. M., Best, M. D., Sano, T., Tsukahara, T., Liliom, K., Igarashi, Y. & Tigyi, G. (2011) The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A-I links platelet activation to LPA production during blood coagulation, *Journal of lipid research*. 52, 958-70.
  75. Amerongen, G. P. v. N., Vermeer, M. A. & van Hinsbergh, V. W. M. (2000) Role of RhoA and Rho Kinase in Lysophosphatidic Acid-Induced Endothelial Barrier Dysfunction, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20, e127-e133.
  76. Neidlinger, N. A., Larkin, S. K., Bhagat, A., Victorino, G. P. & Kuypers, F. A. (2006) Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction, *Journal of Biological Chemistry*. 281, 775-781.
  77. Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D. J., Wang, D., Shih, P. T., Lee, H., Tigyi, G. & Berliner, J. A. (1999) Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 79, 1227-1235.
  78. Kremer, A. E., van Dijk, R., Leckie, P., Schaap, F. G., Kuiper, E. M., Mettang, T., Reiners, K. S., Raap, U., van Buuren, H. R., van Erpecum, K. J., Davies, N. A., Rust, C., Engert, A., Jalan, R., Oude Elferink, R. P. & Beuers, U. (2012) Serum autotaxin is increased in pruritus of cholestasis, but not of other origin, and responds to therapeutic interventions, *Hepatology*. 56, 1391-400.
  79. Bando, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. & Inoue, K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors, *FEBS Lett*. 478, 159-65.
  80. Masuda, A., Nakamura, K., Izutsu, K., Igarashi, K., Ohkawa, R., Jona, M., Higashi, K., Yokota, H., Okudaira, S., Kishimoto, T., Watanabe, T., Koike, Y., Ikeda, H., Kozai, Y., Kurokawa, M., Aoki, J. & Yatomi, Y. (2008) Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma, *British journal of haematology*. 143, 60-70.
  81. Kondo, K. (1969) Differences in hematopoietic death among inbred strains of mice, *Comparative cellular and species radiosensitivity*, 20-29.
  82. Kondo, T. (1997) The NOA mouse, a new hair-deficient mutant (A possible animal model of allergic dermatitis), *Mouse Genome*. 95, 698-700.

83. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. & Tanaka, S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 267, C204-C210.
84. Bligh, E. & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 37, 911-917.
85. Macala, L., Yu, R. & Ando, S. (1983) Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry, *Journal of lipid research*. 24, 1243-1250.
86. Andoh, T., Nagasawa, T., Satoh, M. & Kuraishi, Y. (1998) Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 286, 1140-1145.
87. Inagaki, N., Nagao, M., Igeta, K., Kawasaki, H., Kim, J. F. & Nagai, H. (2001) Scratching behavior in various strains of mice, *Skin Pharmacology and Physiology*. 14, 87-96.
88. Hashimoto, T., Ohata, H. & Momose, K. (2004) Itch-scratch responses induced by lysophosphatidic acid in mice, *Pharmacology*. 72, 51-56.
89. 安東嗣修 & 倉石泰 (2007) かゆみの動物実験法, *日本薬理学雑誌*. 130, 386-392.
90. Yamaguchi, T., Nagasawa, T., Satoh, M. & Kuraishi, Y. (1999) Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT<sub>2</sub> receptors in mice, *Neuroscience research*. 35, 77-83.
91. Yamamoto, A. & Sugimoto, Y. (2010) Involvement of peripheral mu opioid receptors in scratching behavior in mice, *European journal of pharmacology*. 649, 336-341.
92. Tomsig, J. L., Snyder, A. H., Berdyshev, E. V., Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D. N. & Lynch, K. R. (2009) Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo, *The Biochemical journal*. 419, 611-8.
93. Salous, A. K., Panchatcharam, M., Sunkara, M., Mueller, P., Dong, A., Wang, Y., Graf, G. A., Smyth, S. S. & Morris, A. J. (2013) Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice, *Journal of lipid research*. 54, 2775-84.
94. Koike, S., Keino - Masu, K., Ohto, T. & Masu, M. (2006) The N - terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide, *Genes to cells*. 11, 133-142.
95. Jansen, S., Stefan, C., Creemers, J. W., Waelkens, E., Van Eynde, A., Stalmans, W. & Bollen, M. (2005) Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D, *Journal of cell science*. 118, 3081-3089.
96. Hausmann, J., Kamtekar, S., Christodoulou, E., Day, J. E., Wu, T., Fulkerson, Z., Albers, H. M., van Meeteren, L. A., Houben, A. J., van Zeijl, L., Jansen, S., Andries, M., Hall, T., Pegg, L. E., Benson, T. E., Kasiem, M., Harlos, K., Kooi, C. W., Smyth, S. S., Ovaa, H., Bollen, M., Morris, A. J., Moolenaar, W. H. & Perrakis, A. (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin, *Nature structural & molecular biology*. 18, 198-204.

97. Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, E., Dohmae, N., Inoue, A., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J. & Nureki, O. (2011) Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators, *Nature structural & molecular biology*. 18, 205-12.
98. Fulkerson, Z., Wu, T., Sunkara, M., Kooi, C. V., Morris, A. J. & Smyth, S. S. (2011) Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells, *The Journal of biological chemistry*. 286, 34654-63.
99. Pamuklar, Z., Federico, L., Liu, S., Umezū-Goto, M., Dong, A., Panchatcharam, M., Fulkerson, Z., Berdyshev, E., Natarajan, V., Fang, X., van Meeteren, L. A., Moolenaar, W. H., Mills, G. B., Morris, A. J. & Smyth, S. S. (2009) Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis, *The Journal of biological chemistry*. 284, 7385-94.
100. Houben, A. J., van Wijk, X. M., van Meeteren, L. A., van Zeijl, L., van de Westerloo, E. M., Hausmann, J., Fish, A., Perrakis, A., van Kuppevelt, T. H. & Moolenaar, W. H. (2013) The Polybasic Insertion in Autotaxin  $\alpha$  Confers Specific Binding to Heparin and Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans, *Journal of Biological Chemistry*. 288, 510-519.
101. Tokumura, A., Miyake, M., Yoshimoto, O., Shimizu, M. & Fukuzawa, K. (1998) Metal-ion stimulation and inhibition of lysophospholipase D which generates bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma, *Lipids*. 33, 1009-1015.
102. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. & Arai, H. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways, *Journal of Biological Chemistry*. 277, 48737-48744.
103. Ferry, G., Moulharat, N., Pradere, J. P., Desos, P., Try, A., Genton, A., Giganti, A., Beucher-Gaudin, M., Lonchampt, M., Bertrand, M., Saulnier-Blache, J. S., Tucker, G. C., Cordi, A. & Boutin, J. A. (2008) S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 327, 809-19.
104. Endo, T., Kano, K., Motoki, R., Hama, K., Okudaira, S., Ishida, M., Ogiso, H., Tanaka, M., Matsuki, N. & Taguchi, R. (2009) Lysophosphatidylmethanol is a pan lysophosphatidic acid receptor agonist and is produced by autotaxin in blood, *Journal of biochemistry*. 146, 283-293.
105. Renbäck, K., Inoue, M. & Ueda, H. (1999) Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice, *Neuroscience letters*. 270, 59-61.
106. Bigliardi-Qi, M., Sumanovski, L., Büchner, S., Rufli, T. & Bigliardi, P. (2004) Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin, *Dermatology*. 209, 183-189.
107. Phan, N. Q., Bernhard, J. D., Luger, T. A. & Ständer, S. (2010) Antipruritic treatment

with systemic  $\mu$ -opioid receptor antagonists: a review, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 63, 680-688.

108. Kim, H. J., Kim, H., Han, E.-S., Park, S.-M., Koh, J.-Y., Kim, K.-M., Noh, M.-S., Kim, J.-J. & Lee, C.-H. (2008) Characterizations of sphingosylphosphorylcholine-induced scratching responses in ICR mice using naltrexon, capsaicin, ketotifen and Y-27632, *European journal of pharmacology*. 583, 92-96.

109. He, P., Liu, B., Curry & FE (1997) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on endothelial  $[Ca^{2+}]_i$  and microvessel permeability, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 272, H176-H185.

110. Snyman, J., De Sommers, K., Gregorowski, M. & Boraine, H. (1992) Effect of cetirizine, ketotifen and chlorpheniramine on the dynamics of the cutaneous hypersensitivity reaction: a comparative study, *European journal of clinical pharmacology*. 42, 359-362.

111. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juarez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lazaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L. D. & Rosenbaum, T. (2012) Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site, *Nature chemical biology*. 8, 78-85.

112. Natori, K., Tamari, M., Watanabe, O., Onouchi, Y., Shiimoto, Y., Kubo, S. & Nakamura, Y. (1999) Mapping of a gene responsible for dermatitis in NOA (Naruto Research Institute Otsuka Atrichia) mice, an animal model of allergic dermatitis, *Journal of human genetics*. 44, 372-376.

113. Kohara, Y., Tanabe, K., Matsuoka, K., Kanda, N., Matsuda, H., Karasuyama, H. & Yonekawa, H. (2001) A major determinant quantitative-trait locus responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9, *Immunogenetics*. 53, 15-21.

114. Watanabe, O., Tamari, M., Natori, K., Onouchi, Y., Shiimoto, Y., Hiraoka, I. & Nakamura, Y. (2001) Loci on murine chromosomes 7 and 13 that modify the phenotype of the NOA mouse, an animal model of atopic dermatitis, *Journal of human genetics*. 46, 221-224.

115. Morar, N., Willis-Owen, S. A., Moffatt, M. F. & Cookson, W. O. (2006) The genetics of atopic dermatitis, *Journal of allergy and clinical immunology*. 118, 24-34.

116. Suto, H., Matsuda, H., Mitsuishi, K., Hira, K., Uchida, T., Unno, T., Ogawa, H. & Ra, C. (1999) NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis, *International archives of allergy and immunology*. 120, 70-75.

117. Nakasaki, T., Tanaka, T., Okudaira, S., Hirosawa, M., Umemoto, E., Otani, K., Jin, S., Bai, Z., Hayasaka, H. & Fukui, Y. (2008) Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions, *The American journal of pathology*. 173, 1566-1576.

118. Zhang, Y., Chen, Y.-C. M., Krummel, M. F. & Rosen, S. D. (2012) Autotaxin through

lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells, *The Journal of Immunology*. 189, 3914-3924.

119. Hozumi, H., Hokari, R., Kurihara, C., Narimatsu, K., Sato, H., Sato, S., Ueda, T., Higashiyama, M., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S. & Miura, S. (2013) Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 93, 508-19.

120. Watanabe, O., Natori, K., Tamari, M., Shiimoto, Y., Kubo, S. & Nakamura, Y. (1999) Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis, *Journal of human genetics*. 44, 173-176.

121. Ständer, S., Raap, U., Weisshaar, E., Schmelz, M., Mettang, T., Handwerker, H. & Luger, T. A. (2011) Pathogenesis of pruritus, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 9, 456-463.

122. Lee, H., Lin, C. I., Liao, J.-J., Lee, Y.-W., Yang, H. Y., Lee, C.-Y., Hsu, H.-Y. & Wu, H. L. (2004) Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi-and NF- $\kappa$ B-dependent mechanism, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 287, C1657-C1666.

123. Mori, K., Kitayama, J., Aoki, J., Kishi, Y., Shida, D., Yamashita, H., Arai, H. & Nagawa, H. (2007) Submucosal connective tissue-type mast cells contribute to the production of lysophosphatidic acid (LPA) in the gastrointestinal tract through the secretion of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD), *Virchows Archiv*. 451, 47-56.

124. Magalhaes, K., Almeida, P. E., Atella, G., Maya-Monteiro, C. M., Castro-Faria-Neto, H., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H. L., Bozza, M. T. & Bozza, P. T. (2010) Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms, *The Journal of infectious diseases*. 202, 1369-79.

125. Strachan, D. P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size, *BMJ: British Medical Journal*. 299, 1259.

126. Chen, Y. & Blaser, M. J. (2007) Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy, *Archives of Internal Medicine*. 167, 821.

127. Noverr, M. C. & Huffnagle, G. B. (2004) Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?, *Trends in microbiology*. 12, 562-568.

128. Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H. & Holst, O. (2007) *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties, *Journal of allergy and clinical immunology*. 119, 1514-1521.

129. Balazs, L., Okolicany, J., Ferrebee, M., Tolley, B. & Tigyi, G. (2001) Topical application



of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280, R466-72.

130. Demoyer, J. S., Skalak, T. C. & Durieux, M. E. (2000) Lysophosphatidic acid enhances healing of acute cutaneous wounds in the mouse, *Wound Repair Regen.* 8, 530-7.

131. Peyruchaud, O. (2009) Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 9, 381-391.

## 論文目録

### 公刊論文

1. Shimizu Y, Murao K, Tanaka T, Kubo Y, Tokumura A. (2014) Increased lysophospholipase D activity of autotaxin in sera of patients with atopic dermatitis. Journal of dermatological science. In press.
2. Shimizu Y, Morikawa Y, Okudaira S, Kimoto S, Tanaka T, Aoki J, Tokumura A. (2014) Potentials of the circulating mediator lysophosphatidic acid in development of allergic skin inflammation in mice: role of blood cell-associated lysophospholipase D activity of autotaxin. American journal of pathology. In press.

### 公刊参考論文

1. Kotosai M, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, Tokumura A, Nakamura T, Murota K, Kawai Y, Terao J. (2013) Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. Lipids. 48, 569-78.
2. Ino M, Shimizu Y, Tanaka T, Tokumura A. (2012) Alterations of plasma levels of lysophosphatidic acid in response to fasting of rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 35, 2059-63.
3. Tokumura A, Taira S, Kikuchi M, Tsutsumi T, Shimizu Y, Watsky MA. (2012) Lysophospholipids and lysophospholipase D in rabbit aqueous humor following corneal injury. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 97, 83-89.
4. Tsuboi K, Okamoto Y, Ikematsu N, Inoue M, Shimizu Y, Uyama T, Wang J, Deutsch DG, Burns MP, Ulloa NM, Tokumura A, Ueda N. (2011) Enzymatic formation of *N*-acylethanolamines from *N*-acylethanolamine plasmalogen through *N*-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and-independent pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 1811, 565-577.
5. Inoue M, Adachi M, Shimizu Y, Tsutsumi T, Tokumura A. (2011) Comparison of lysophospholipid levels in rat feces with those in a standard chow. Journal of agricultural and food chemistry. 59, 7062-7067.

### その他（総説・単行本）

1. Shimizu Y, Tokumura A. (2011) Physiological role of lysophosphatidic acid and its relevance physiological role of lysophosphatidic acid and its relevance to diseases. Seikagaku. 83, 506-17. Review. Japanese.

## 謝 辞

本研究の遂行に際し、終始適切な御指導御鞭撻を賜りました徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部衛生薬学研究室 徳村彰教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御協力、御助言を頂きました徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 田中保准教授、久保宜明教授、村尾和俊准教授、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 青木淳賢教授、奥平真一先生、日本クレア株式会社 富士宮技術サービスセンター技術部 森川美幸氏、木本重信氏、大塚製薬工場 近藤泰三博士、川野剛氏、福永徹也氏に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を通じ御協力を頂きました徳島大学薬学部衛生薬学教室の卒業生ならびに在校生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、終始にわたり応援し、協力してくださいました両親と家族に心より感謝いたします。

2014 年 1 月